Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju
i zaštitu životne sredine

Potencijal neutralizacije DPPH radikala kao merilo antioksidantne aktivnosti ekstrakata lišća različitih sorti vinove loze (*Vitis vinifera* L.)

-Završni rad-

Mentor:
dr Ivana Beara

Kandidat:
Luka Banjac 539/11

Novi Sad, 2016

Eksperimentalni deo ovog master rada urađen je u laboratoriji za biohemiju lekovitog bilja na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Zahvaljujem se svom mentoru docentu dr Ivani Beari na pomoći, sugestijama i korisnim savetima koji su mi pomogli tokom pisanja ovog rada.

Docentu dr Mariji Lesjak se zahvaljujem na interesovanju i pomoći pri izradi ovog rada.

Dr Nataši Simin se zahvaljujem na podršci, savetima i korisnim sugestijama tokom pisanja rada.

Doktorantkinjama Tatjani Majkić i Diandri Pintać se posebno zahvaljujem na velikoj pomoći, pozitivnoj energiji i ogromnoj podršci prilikom izrade ovog rada, kao i na svemu što su me naučile tokom eksperimentalnog rada.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, devojci Nikolini i prijateljima koji su uvek bili uz mene i bez čije podrške ne bih uspeo.

Novi Sad, oktobar 2016. *Luka Banjac*

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Opšti deo 2

   2.1. Rod Vitis 2

      2.1.1. Vrsta Vitis vinifera L. 3

   2.2. Slobodni radikali i antioksidativni sistemi 9

      2.2.1. Slobodni radikali 9

      2.2.2. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita 12

      2.2.3. Fenolna jedinjenja 12

      2.2.4. Flavonoidi 14

      2.2.5. Test neutralizacije DPPH radikala 15

3. EKSPERIMENTALNI DEO 17

   3.1. Priprema ekstrakata lišća 17

   3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola 18

   3.3. Određivanje sadržaja flavonoida 20

   3.4. Određivanje neutralizacije DPPH radikala 22

4. REZULTATI I DISKUSIJA 26

   4.1. Ukupni fenoli 26

      4.2. Ukupni flavonoidi 28

      4.3. Neutralizacija DPPH radikala 29

5. ZAKLJUČAK 33

6. Literatura 34

7.- Prilog 42

BIOGRAFIJA 64

1. Uvod

U različitim delovima sveta se biljke i biljni proizvodi tradicionalno koriste u medicinske svrhe. Stoga, danas, biljke koje unosimo ishranom ne konzumiramo samo zbog nutritivnih svojstava, već i zbog njihove potencijalne primene u prevenciji i tretmanu različitih oboljenja. Naučnici poslednjih decenija intenzivno istražuju hemijski sastav hrane biljnog porekla na osnovu koga bi preferirali određene namirnice za upotrebu u ishrani.

Veliki rod *Vitis,* kome pripada i biljka ispitivana u ovom radu (*Vitis vinifera L.*-vinova loza), je obuhvaćen ovim istraživanjima, jer su se vrste ovog roda od davnina primenjivale u narodnoj i tradicionalnoj medicini. Takođe, plod vinove loze, grožđe, je široko zastupljen u ishrani, kao suvo ili sveže grožđe, u vidu rakije ili vina. Tokom godina, utvrđeno je da vinova loza ispoljava veoma blagotvorno dejstvo na čovekovo zdravlje, kako putem hrane, tako i korišćenjem preparata na bazi ove vrste. Različiti delovi vinove loze su se uglavnom upotrebljavali u tretmanu kardiovaskularnih oboljenja, jer predstavljaju prirodni tonik organizma.

Cilj ovog rada je bio da se odredi antioksidantni potencijal ekstrakata lišća različitih sorti vinove loze (*Vitis vinifera* L.) i zavisnost ove aktivnosti od sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, sekundarnih biomolekula, za koje se smatra da su glavni nosioci antioksidantne aktivnosti biljaka. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, kao i antioksidantni potencijal određeni su primenom standardnih spektrofotometrijskih testova. Antioksidantna aktivnost je ispitana testom koji je zasnovan na transferu elektrona, odnosno sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (DPPH test).

2. Opšti deo

2.1. Rod Vitis

Rod *Vitis* se sastoji od oko 70 vrsta cvetnica iz familije *Vitaceae* (lijane). Ove vrste su uglavnom rasprostranjene na severnoj hemisferi, prvenstveno u umerenim klimatskim zonama Severne Amerike i Azije, i u manjoj meri u tropskom pojasu. Prema nekim istraživanjima ovaj rod se deli na dva podroda (koja se genetski razlikuju po broju hromozoma): *Euvitis* Planch. ($2n=6x=38$ hromozoma) i *Muscadinia* Planch. ($2n=6x=40$ hromozoma) koji sadrži samo dve vrste (*V. Rotundifolia i V. Popenoei*; Aradhya i sar., 2004)**.** U okviru podroda *Euvitis* su tri velike geografske grupe: severnoameričke vrste, istočno azijske i evropsko-zapadno-azijske vrste (Jing i sar., 1999).

Vrste roda *Vitis* su drvenaste puzavice koje mogu da narastu i do 35 metara uz neku čvrstu potporu. Odlikuju se rašljikama koje im služe da se „hvataju“ za potporni predmet. Takođe, karakterišu ih i jednostavni listova, spojene cvetne latice koje se razdvajaju u osnovi i mekani, sočni plodovi. Listovi biljaka ovog roda su dlakavi i poseduju pet glavnih vena i račvaste žilice. Kora im starenjem postaje hrapava, i nastaju čvorovi sa opnama i meko sekundarno drvo. Sve biljke mogu formirati pomoćne korene čije se širenje može pospešiti sečenjem, jer se na tim mestima koren lakše grana (Keller, 2010).

Pripadnici roda *Vitis* se razlikuju od srodnih rodova na osnovu cvetnih karakteristika. Cvetovi predaka ovog roda su bili uglavnom hermafroditni, dok su cvetovi današnjih vrsta tipično jednopolni. Muški cvetovi poseduju uspravne prašnike, a nedostaje im u potpnosti razvijen tučak, dok ženski sadrže funkcionalan tučak i produkuju zakržljali savijen prašnik ili nemaju prašnik (Longobottom i sar., 2008). Ukoliko se uspešno opraši, cvet postaje bobica grožđa, a cvast prelazi u grozd (Josifović 1972; https://en.wikipedia.org/wiki/Vitis-20.08.2016). Za razliku od cvetova koji su mali, plodovi mogu biti krupni, različitih boja i oblika.

Plod nekoliko vrsta iz roda *Vitis* se koristi u ishrani različitih kultura za proizvodnju mermelada, džemova i vina. Takođe, zbog brojnih bioloških aktivnosti (antioksidantna, antimirkobna, antitumorska, antiinflamatorna i kardioprotektivna, hipoglikemijska i vazorelaksantna) ove biljke su zastupljene i u tradicionalnoj medicini, a privukle su i pažnju mnogih naučnika današnjice u cilju otkrivanja potencijalne primene u tretiranju i prevenciji različitih oboljenja (Keller, 2010; Xia i sar.,2010).

2.1.1. Vrsta Vitis vinifera L.

Prirodno stanište vrste *Vitis vinifera* L. obuhvata teritorije zapadne Azije i Evrope, u opsegu od 30 do 50 stepeni geografske širine severne hemisfere, odnosno u umerenom pojasu. Međutim, zbog široke primene i blagotvornih efekata ove biljke, ljudi su počeli da je gaje i na drugim kontinentima (Mullins i sar*.,* 1992; Hardie, 2000; Zohary i Hopf, 2001). Danas je *V. vinifera* najrasprostranjenija vrsta unutar roda *Vitis*, i jedna od najraspostranjenih biljaka uopšte, jer joj pripadaju sve poznatije sorte vinove loze koje se gaje u prehrambene svrhe i za proizvodnju vina. Kultivisane vrste *V. vinifera* L. imaju hermafroditne, ili ređe, fiziološki ženske cvetove, na osnovu čega se često grpišu u dve podvrste: *V. vinifera* (ssp.) *sativa* i *V. vinifera* (ssp.) *sylvestris.* Međutim, mnogi naučnici se ne slažu sa ovom podelom jer smatraju da je *V. vinifera* (ssp.) *sativa* samo kultivisana forma *V. vinifera* (ssp.) *sylvestris*, tačnije, da je razlika između ove dve forme samo rezultat pripitomljavanja (This i sar*.*, 2006).

V. vinifera spada u višegodišnje listopadne lijane, koje mogu narasti i do 30m (uz potporu nekog predmeta ili drveta). Kao biljni organizam obuhvata vegetativne (koren, stablo, grane, lišće i rašljike) i reproduktivne (cvetove i bobice) strukture. Vinova loza poseduje izuzetno razvijen koren, koji čini više od 50% njene biomase i pomaže biljci da opstane u zahtevnim i sušnim uslovima. Kod vinove loze razlikujemo korenov sistem koji nastaje iz semena – korenov sistem sejanca, i onaj koji nastaje iz pojedinih vegetativnih delova loze – adventivni korenov sistem. Korenov sistem sejanca ima loza koja je razmnožena semenom, a adventivni korenov sistem nastaje iz vegetativnih delova loze, najčešće iz zelenih ili zrelih lastara (Kuljančić, 2007). Usled razvijenog korenovog sistema, može da trpi sušu i da daje plodove u relativno teškim uslovima i zemljištima siromašnim humusom i hranljivim materijama (Milosavljević, 1998).

Kora mladog stabla je glatka i sa sitnim dlačicama, a vremenom postaje hrapava i drvenasta. Lišće je dugačko i široko od 5 do 20 cm, uglavnom je u obliku šake sa tri do pet režnjeva. Lice lista je uglavnom glatko, dok je naličje obraslo sitnim dlačicama (Josifović, 1972). Često se oblik i karakteristike lišća koriste u determinaciji sorte vinove loze (Žunić, 2000). Cvetovi su dvopolni ili funkcionalno ženski sa kratkim unazad povijenim, sterilnim prašnicima.

Pri oplođenju cveta nastaje bobica, a cvast vinove loze postaje grozd. Grozd se sastoji iz dva jasno odvojena dela: bobice i šepurine. Bobice su sa šepurinom spojene peteljčicama. Oblik, težina i veličina grozda zavise od sorte i uslova sredine. Ipak, po obliku grozda mogu se svrstati u nekoliko osnovnih tipova: valjkast (cilindričan), kupast, valjkasto-kupast, krilast i razgranat (Kuljančić, 2007). Meso bobica je sočno i slatko i različitog je ukusa od sorte do sorte. Plodovi su uglavnom okruglastog oblika, ali mogu biti i izduženog i jajastog oblika i mogu veoma varirati u bojama. Vinova loza cveta u maju i junu, a prvi plodovi se pojavljuju krajem avgusta i početkom septembra. Plod loze, grožđe, koristi se u ishrani, kao sveže ili suvo grožđe, i za proizvodnju sokova i vina, zbog čega se najviše i uzgaja. Osim ploda, prvenstveno na Mediteranu, su u upotrebi i drugi delovi biljke, pa se lišće koristi u tradicionalnoj medicini i ishrani (sarme), dok seme služi za izolovanje aktivnih jedinjenja i dobijanje ulja koje se koristi u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Usled najšire primene, istaživanja hemijskog sastava vrste *V. vinífera*. su prvenstveno usmerena ka hemijskoj karakterizaciji semenki, ploda i vina (kao glavnog produkta ove vrste). Dobijeni rezultati dokazuju prisustvo mnogih organskih kiselina, fenolnih jedinjenja, lipida, enzima, neredukujućih i redukujućih šećera, terpena i karotenoida. Različite sorte sadrže različit odnos ovih jedinjenja, a pre svega je ta razlika primetna između belih i crvenih sorti vinove loze, pri čemu se najveće razlike se uočavaju u sadržaju fenolnih jedinjenja u u plodovima ovih sorti. Naime, najzastupljenija jedinjenja pronađena u opni bobica crvenog grožđa su antocijani (3-*O*-monoglukozidi i 3-*O*-acilovani monoglukozidi), dok je u opni belog grožđa utvrđeno prisustvo flavan-3-ola ((+)-katehin, (-)-epikatehin, kamferol, kvercetin). Trans rezveratrol je stilbenoid prisutan u koži i u samom drvetu *V. vinífera* (Chacona i sar, 2009). Sveži sok grožđa je bogat vitaminima A, B i C i raznim mineralima. Grožđe deluje kao prirodni tonik organizma, a osim toga je i izrazito hranljiva namirnica jer sadrži oko 20% šećera. Ovo voće je takođe veoma važan izvor bioflavonida, koji štite organizam od slobodnih radikala (Şendoğdu i sar., 2006) i imaju antioksidantno dejstvo.

Upornim i dugotrajnim pokušajima kultivisanja, ukrštanja i modifikacija divljih vrsta *V. vinifera*, dobijene su mnoge sorte. Te gajene sorte se u znatnoj meri razlikuju od divljih, prvenstveno po pitanju opšte morfologije i fiziologije same biljke, cvetova, listova i plodova, a samim tim i po kvalitetu plodova i kvalitetu vina koje se od njih pravi. Sorte *V. vinifera* korišćene u ovom radu su: *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Frankovka*, *Italijanski rizling, Chardonnay* , *Muscat de Hamburg* (*Muskat Hamburg*), *Župljanka i Sila*.

Cabernet Sauvignon je sorta francuskog porekla. Listovi su mu tamno zeleni bez uočljivih malja, srednje veličine sa karakterističnim dubokim i potpuno zatvorenim bočnim sinusima. Grozd je mali do srednji, često sa jednim izrazenim krilom, srednje zbijen. Zrno je srednje veličine i okruglo, dok je kožica modro ljubičaste boje, čvrsta. Meso je čvrsto, izraženog zelenog tona i slatko. Povoljna je za područje umerene klime (Milosavljević, 1998). Vino ove sorte odlikuje tamnocrvena rubin boja, i obično se konzumira nakon što godinu dana odleži u buradima. Spada u suva, crvena vina. Ima visok sadržaj tanina, aroma podseća na šumsko voće, papriku, čokoladu i karanfilić. Sadržaj kiselina je veći, ali je ukus ipak harmoničan, jer zri u hrastovom buretu (http://www.vinumlodi.rs/vino/cabernet-sauvignon, 6.10.2016).

Merlot je takođe sorta poreklom iz Francuske, iz bordovskog vinogorja, a danas se gaji u celom svetu. Odlikuju je jaki tamnozeleni listovi, dok su grozdovi sitni ili srednje krupni, zbijeni, a plodovi okrugli, sitni sa debelom pokožicom, tamnoplave boje. Meso je sočno i slatko (Milosavljević, 1998). Vino ove sorte podseća na *Cabernet Sauvignon,* a pravilnim čuvanjem i pravovremenom konzumacijom dobija se vino čiji ukus podseća na borovnicu, kupinu i crno-ribizu. Ovo vino je manje kiselo od svog „srodnika'' *Cabernet Sauvignon-a,* pa u ustima ostavlja puniji ukus (http://www.vino.rs/svet-vina/vrste/crvena/item/251-merlot.html, 6.10.2016).

Frankovka je sorta čije poreklo nije utvrđeno, ali se predpostavlja da je iz Austrije, gde je najviše i rasprostranjena. Ima veoma izražene čokote, krupne i okrugle listove sa plitkim urezima i peteljkinim sinusom u obliku slova „V“, cilindrične krupne grozdove i plod sa debelom pokožicom tamnoplave boje. Meso ove sorte je sočno, neutralnog ukusa sa manjim sadržajem šećera i visokim sadržajem kiseline. Za severnije vinogradarske rejone, *Frankovka* spada u red privredno veoma značajnih sorti (Milosavljević, 1998). Vino spada u stona crvena vina, odlikuje ga zagasito crvena boja i miris na borovnicu i zrelu višnju s primesama hrastovine. Punog je ukusa sa lepo ukomponovanim taninima i kiselinama (http://www.prodavnica.vino.rs/roze/roze/frankovka-vinum, 6.10.2016.)

Italijanski rizling je jedna od belih vinskih sorti koja dominira na balkanskom tržištu, naročito u Vojvodini. Čokot je srednje bujnosti, a list je takođe srednje veličine, petodelan, sa nervima i peteljkom izrazito zelene boje. Grozd je mali i valjkast, sa krilcem. Bobice su mu zelenožute boje, male, okrugle, sa jasno istaknutim pupkom i sočnim mesom. Odlikuje se redovnom i dobrom rodnošću, sposobnošću samoregulacije vegetativno generativnog potencijala i relativno dobrom otpornošću na mrazeve. Daje harmonična, pitka, kvalitetna vina. Zbog poznog sazrevanja i variranja kvaliteta grožđa i vina, izvršena je klonska selekcija ove sorte u Sremskim Karlovcima. (Cindrić, 1990). U proizvodnji je najbolje rezultate pokazao klon SK 54 (Cindrić, 2000), koji sadrži preko 20% šećera, obilno rađa i daje pitka, harmonična vina sa finim voćnim kiselinama. Italijanski Rizling spada u suva bela vina. Ima kristalno svetložutu boju. U mirisu se osećaju cvetovi loze i rezede, a u aromi i cvetovi bagrema (http://www.vinumlodi.rs/vino/italijanski-rizling, 6.10.2016.).

Chardonnay je sorta francuskog porekla, raširena u vinogradarskim područjima celog sveta. Dosta je homogena, a glavne razlike izmedju klonova odnose se narocito na organoleptička svojstva grozđa. List je svetlozelene boje, okruglast, najčešće trodelni, s peteljkinim sinusom u obliku slova „U" čiji je najdublji deo oivičen nervima, a na obodima se nalaze oštri i neujednačeni zupci. Grozd je srednje veličine, širok sa jednim istaknutim krilom (sugrozdom), dosta zbijen. Bobica je srednje veličine, žutozelene boje, sa srednje čvrstom kožicom i sočnim, slatkim mesom sa istaknutom aromom sorte. (Milosavljević, 1998). Vrlo je dobra sorta za visokokvalitetna bela vina, prvenstveno severnjačkih regiona, ali daje dobra vina i u uslovima toplije klime. Grožđe *Chardonnay*-a se koristi i za proizvodnju penušavih vina.Vino je slamnasto žute boje sa odsjajem kristalne bistrine. Izrazita aromatičnost mirisa i kompleksna punoća ukusa sa blagim tonom gorčine u pozadini, podseća na ukus smokve i badema (http://www.vinarijakovacevic.co.rs/sardone.html, 6.10.2016.).

Muskat Hamburg potiče iz Engleske. Veoma je rasprostranjena sorta, posebno u Francuskoj, Mađarskoj, Italiji i Bugarskoj. Karakterišu je srednje krupni, trodelni ili petodelni listovi, hermafroditan cvet i velike bobice okruglog, izduženog oblika. Grozd je velik i razgranat, a pokožica je tanka, plavocrna. Sok je bezbojan, izrazito muskatnog mirisa. Ova sorta se najčešće koristi za proivodnju stonih crvenih vina (Milosavljević, 1998). Vino je poluslatko, kristalne boje rubina, sa muskatnim aromama koje asociraju na maline, jagode i kandirano voće (www.vinotekabeograd.com, 6.10.2016).

Župljanka i *Sila* su autotohne bele vinske sorte koje se najviše gaje u Vojvodini. U vinogorjima gde su se ove sorte rasprostranile, *Župljanka* i *Sila* su ispoljile zadovoljavajuća svojstva i predstavljaju perspektivne sorte (Milosavljević, 1998).

Župljanka je nastala ukrštanjem: *Prokupca* i *Pino noir*-a koju su izveli profesor dr Dragoslav Milisavljević i njegovi saradnici. Čokot joj je vrlo bujan, a list krupan, trodelan ili petodelan, tamnozelen sa oštrim zupcima žućkaste boje. Naličje liske je umereno maljavo. Ima grozd srednje veličine, srednje zbijen sa dugom zeljastom drškom. Bobice su srednje krupnoće, ovalne, zelenožute boje, sa smeđim tačkicama. Pokožica je čvrsta, pulpa sočna, bez posebnog mirisa i arome. Sadržaj šećera varira od 21% do 24%. Daje visoke i redovne prinose. Srednje je otporna na mrazeve (Milosavljević, 1998). Župljanka je lagano, suvo belo vino zelenkasto žute boje. U ukusu se osećaju specifične arome voća, ali preovladava aroma grožđa (http://www.vinumlodi.rs/vino/%C5%BEupljanka, 6.10.2016.).

Sila je stvorena ukrštanjem Kevidinke i Šardonea. Priznata je 1988. godine i dobila je ime po inicijalima prvog autora dr Sime Lazića. Najviše se gaji se u fruškogorskom vinogorju. Daje visoke prinose. Odlikuju je trodelni ili petodelni krupni tamnozeleni listovi sa oštrim ivicama žućkaste boje i srednje krupni rastresiti grozdovi sa plodovima žutozelene boje (Milosavljević, 1998). Vino ove sorte spada u suva stona bela vinau kom dominiraju arome breskve, jabuke i kruške (http://www.prodavnica.vino.rs/roze/roze/sila-rittium, 6.10.2016.).

2.1.1.1. Hemijski sastav, biološka aktivnost i primena lišća Vitis vinifera L.

Vinova loza, uključujući i lišće, ima veliku primenu u tradicionalnoj medicini. U Ajurvedi, lišće vinove loze, se koristi kao sredstvo za lečenje dijareje i lek protiv povraćanja. U Evropskoj farmakopeji, lišće vinove loze se primenjuje u tradicionalnoj medicini zbog svog adstrigentnog i homeostatičkog svojstva, odnosno za tretman dijareje, krvarenja, hemoroida, proširenih vena i drugih bolesti cirkulacije (Bombardelli i Morazzoni, 1995; Lardos i Krauter, 2000; Orhan i sar., 2006). Zbog svojih blagotvornih efekata, lišće vinove loze je predmet mnogih istraživanja, koja su usmerena kako na ispitvanje hemijskog sastava, tako i na ispitivanje biološke aktivnosti. Rezultatima ovih istraživanjia utvrđeno je da lišće vinove loze sadrži mnoga hemijska jedinjenja koja doprinose njihovom biološkom potencijalu. U *Tabeli 2.1.* je prikazan pregled jedinjenja detektovanih u lišću vinove loze.

Tabela 2.1. Hemijski sastav lista vinove loze

Klasa jedinjenja	Jedinjenje	Referenca
Organske kiseline	Jabučna kiselina, oksalna kiselina, fumarna kiselina, askorbinska kiselina, limunska kiselina i vinska kiselina kiselina	Orhan i sar., 2006
Alkoholi	etanol, 1-butanol, 1-pentenol, 1-heksenol	Hebash i sar., 1991.
Aldehidi	2 i 3-metil butanal, 1- propanal, 2-petil propanal, 2-metil pentanal, 1-pentanal, 2-pentenal, heptanal	Hebash i sar., 1991.
Lipidi	Gliceridi, voskovi i masne kiseline (zasićene : palmitinska i miristinska;nezasićene: palmitoleinska, oleinska i linolenska)	Hebash i sar., 1991.
Ugljeni hidrati	maltoza, celobioza,saharoza i rafinoza	Felicio i sar., 2001.
Vitamini	Vitamini C, B_1,B_2, B_6, A i E	Bombardelli i Morazzonni, 1995
Fenolne kiseline	3-hidroksibenzoeva kiselina galna kiselina, kafena kiselina i vanilinska kiselina;	Katalinić i sar., 2009. Eftehari i sar., 2012
Flavonoidi	(+)-katehin, (–)-epikatehin, (±)-epigalokatehin, (–)-epikatehin-3-*O*-galat, kvercitrin,izokvercitrin, kvercetin,kempferol, rutin,luteolin	Şendoğdu i sar., 2006 Katalinić i sar., 2009
Stilbeni	rezveratrol i, adstringin	Şendoğdu i sar., 2006; Katalinić i sar., 2009
Karotenoidi	lutein i α-karoten	Orhan i sar., 2006.
Terpeni	β-pinen, mircen, cikloartenol, α i β amirin, oleinska kiselinaurosolna kiselina	Bombardelli i Morazzonni, 1995 Orhan i sar., 2006.

Mnogobrojna istraživanja na lišću *V. vinifera* pokazuju da ono ispoljava različite biološke aktivnosti. Naime, *in* vitro ispitivanjima dokazana je antioksidantni, antiviralni, antiproliferativni i antimiotički efekat lišća *V. vinifera (*Orhan i sar., 2006). Antibakterijsko dejstvo dokazano je na *E. coli, P. aeruginosa, E. faecalis i S. aureus*, pri čemu ekstrakti lišća poseduju bolje antibakterijsko dejstvo prema Gram pozitivnim bakterijama. , Pored ovih aktivnosti, *in vivo* testovima na miševima i pacovima dokazana su hepatoprotetktivna, antioksidantna, vazorelaksantna, antiinflamatorna, antipiretička, antinociceptivna i antitumorska aktivnost ekstrakata lišća *V. vinifera* (Orhan i sar., 2006; Singh i sar, 2010). Detaljnija istraživanja ukazuju na to da su fenoli zaslužni za većinu terapeutskih svojstava ove biljke (Orhan i sar., 2006).

2.2. Slobodni radikali i antioksidativni sistemi

Slobodni radikali i antioksidanti su postali široko korišćeni termini u modernim raspravama o mehanizmima bolesti. Zbog toga se dugi niz godina velika pažnja posvećuje upravo izučavanju slobodnih radikala. Naime, slobodni radikali pripadaju reaktivnim vrstama (na čelu sa reaktivnim vrstama kiseonika (Reactive Oxygen Species – ROS) i reaktivnim vrstama azota (Reactive Nitrogen Species - RNS) koji nastaju u organizmu, tokom različitih fiziohemijskih uslova ili patoloških stanja. Ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanata je potrebna kako bi slobodni radikali ostvarili svoju ulogu u fiziološkim funkcijama organizma. Međutim, ukoliko dođe do disbalansa, odnosno ako slobodni radikali nadvladaju telesne kapacitete antioksidativne odbrane, nastaje stanje poznato kao oksidativni stres. U tom slučaju, slobodni radikali negativno menjaju lipide, proteine i DNK . Posledice povećanog oksidativnog stresa mogu biti jedan od faktora koji učestvuje u nastanku velikog broja akutnih i hroničnih oboljenja (Sen, 2001).

Primena antioksidanata iz spoljnih izvora može pomoći u savladavanju ovog oksidativnog stresa. Veštački (sintetički) antioksidanti mogu biti štetni (Halliwell i Gutteridge, 2007), pa se zato poslednjih godina vrše istraživanja kako bi se pronašli efikasni, netoksični prirodni sastojci sa antioksidantnim dejstvima.

2.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže bar jedan nesparen elektron u spoljašnjem elektronskom omotaču. Ovi molekuli su veoma nestabilni, odnosno imaju veliki stepen reaktivnosti zbog tendencije sparivanja nesparenog elektrona. Oni mogu da daju ili uzmu elektron iz drugih molekula, postajući tako oksidanti ili reduktanti (Cheeseman i Slater, 1993). Štetno delovanje slobodnih radikala potiče iz potrebe da postignu elektronsku stabilnost i zato reaguju sa prvim susednim stabilnim molekulom uzimajući njegov elektron i započinjući na taj način lančanu reakciju koja dovodi do biohemijskih, strukturnih, funkcionalnih promena biomolekula (Rimbach i sar., 1999; Young i Woodside, 2001). U *Tabeli 2.2.* je dat prikaz najvažnijih reaktivnih vrsta koje imaju ključnu ulogu u patogenezi mnogih blesti.

Tabela 2.2. Podela reaktivnih vrsta (Halliwell i Gutteridge, 2007)

Reaktivne vrste	Hemijska oznaka	Pun naziv radikala
Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	$O^{\cdot -}_2$	Superoksid
	$OH^{\cdot}$	Hidroksil radikal
	$RO^{\cdot}$	Alkoksil radikal
	$ROO^{\cdot}$	Peroksil radikal
	H_2O_2	Vodonik peroksid
	$^1O_2$	Singletni kiseonik
Reaktivne vrste azota (RNS)	$NO^{\cdot}$	Azot-oksid radikal
	$NO^{\cdot}_2$	Azot-dioksid radikal
	$OONO^-$	Peroksonitrit
Reaktivne vrste hlora	OCl-	Hipohlorni anjon
	Cl-	Atomski hlor

ROS i RNS su produkti normalnog ćelijskog metabolizma, koji imaju i blagotvorne i štetne efekte na ćelije. U niskim ili umerenim koncentracijama, slobodni radikali imaju značajnu fiziološku ulogu koja uključuje odbranu protiv infektivnih agenasa (u toku procesa fagocitoze), ulogu u produkciji energije i ćelijskom rastu, kao i funkciju u ćelijskim signalnim sistemima (Sen i sar., 2001).Istovremeno, ovo su visoko reaktivne vrste, sposobne da u nukleusu i u membranama ćelija biološki oštete određene molekule kao što su DNK (mutacije i promene nativne strukture), proteini, ugljeni hidrati i lipidi (lipidna peroksidacija).

Radikali koji mogu oštetiti DNK su najčešće hidroksilni radikali koji su nastali UV zračenjem, Fentonovom reakcijom ili radiomimetičkim komponentama. Ovi radikali, reaguju sa DNK bazama, kačeći se na π-veze bogate elektronima i na taj način remete nativnu strukturu DNK i izazivaju mutacije (Balasubramanian i sar. 1998). Na sličan način se remeti i struktura proteina. Lipidna peroksidacija je lančana reakcija koja započinje uklanjanjem H-atoma od strane ROS, ili adicijom radikala na polinezasićenu masnu kiselinu (PUFA), pri čemu dolazi do oksidativnog oštećenja, tj. formiranja lipidnih radikala. Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu mnogo su otpornije na delovanje kiseoničnih radikala od polinezasićenih masnih kiselina (Repetto i sar., 2012). Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksil radikal ($HO^{\bullet}$). Međutim, postoje i drugi radikali koji mogu izazvati eliminaciju vodonika i time pokrenuti ovaj proces, kao što su hidroperoksil radikal ($HO_2^{\bullet}$), peroksi radikal ($ROO^{\bullet}$), i alkoksi radikal ($RO^{\bullet}$) (Štefan i sar., 2007). Lipidna peroksidacija može biti neenzimski i enzimski katalizovana.

Takođe, slobodni radikali su u stanju da naruše strukture mnogih polisaharida, kao i nekih monosaharida. Neki prosti šećeri se smatraju radikalskim skevindžerima (Griffiths i Lunec, 1989).

Prema izvoru nastanka slobodni radikali mogu biti interno i eksterno generisani (*Tabela 2.3.).* Naime*, s*lobodni radikali i drugi ROS nastaju i iz normalnih metaboličkih procesa u ljudskom telu i iz spoljašnjih izvora kao što je izlaganje, X-zracima, ozonu, pušenju cigareta, zagađivačima vazduha i industrijskim hemikalijama (Bagchi i Puri, 1998). Stvaranje slobodnih radikala dešava se neprestano kao posledica i enzimskih i neenzimskih reakcija. Enzimske reakcije, koje služe kao izvor slobodnih radikala, obuhvataju one radikale koji su uključeni u respiratorni lanac, u fagocitozu, sintezu prostaglandina i u sistem citohroma P-450. (Liu i sar., 1999). Slobodni radikali mogu se formirati takođe i u neenzimskim reakcijama kiseonika sa organskim jedinjenjima kao i onima koje započinju jonizirajućim reakcijama.

2.2.2. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita

Kao što je i ranije rečeno, ROS i RNS su uveliko prepoznati kao nosioci dvostruke uloge, jer mogu biti i štetni i korisni po žive organizme (Valko i sar., 2006). Štetni efekti slobodnih radikala koji prouzrokuju potencijalna biološka oštećenja nazivaju se oksidativni stres (Kovacic i Jacintho, 2001). Ovo se događa u biološkim sistemima gde dolazi do prekomernog stvaranja ROS/RNS na jednoj strani i nedostatka enzimskih i neenzimskih antioksidanata na drugoj. Drugim rečima, oksidativni stres i predstavlja poremećaj u ravnoteži prooksidantnih/antioksidantnih reakcija u živim organizmima (Valko i sar., 2001; Ridnour i sar., 2005).

Neprekidno izlaganje različitim reaktivnim vrstama nateralo je organizam da razvije brojne mehanizme antioksidativne odbrane. Kako se kiseonik fiziološki metaboliše unutar ćelija, tako mehanizmi antioksidativne odbrane deluju specifično i selektivno sa reaktivnim kiseoničnim vrstama, prvenstveno slobodnim radikalima (ROS) koji oštećuju različite ćelijske molekule i strukture. Antioksidansi mogu da odlože ili spreče oksidaciju supstrata, odnosno deluju tako što sprečavaju nastanak ROS (smanjenjem lokalne koncentracije kiseonika, prekidanjem lanca stvaranja novih radikala, vezivanjem metalnih jona i sl.), da inaktivišu reaktivne kiseonične vrste (npr. razlaganjem peroksida), da smanje njihove efekte ili deluju tako što omogućavaju oporavak od oksidativnih oštećenja, uklanjanjem izmenjenih molekula i popravljanjem oštećenja nastalih njihovim delovanjem (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Na osnovu toga da li su antioksidanti nastali u čovekovom organizmu ili su uneti u organizam, oni se mogu podeliti u dve grupe: endogeni i egzogeni. Endogeni antioksidansi se mogu još podeliti na enzimske (glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza) i neenzimske (α-linoleinska kiselina, koenzim Q10, mokraćna kiselina, itd.). U egzogene antioksidanse spadaju: vitamini C i E, minerali Se i Zn, polifenoli i flavonoidi, karotenoidii drugi.

2.2.3. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu biljnih metabolita koja mogu biti vrlo jednostavne strukture, kao što su fenolne kiseline, ili vrlo složene strukture, odnosno, polikondenzovana jedinjenja kao što su kondenzovani tanini. Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Do danas je identifikovano više od hiljadu fenola, koji se u prirodi nalaze u slobodnom obliku ili, češće, u obliku glikozida (Waterman i Mole, 1994; Leucuta i sar., 2006).

Biljni fenoli su prisutni u svim organima biljaka (u semenu, lišću, korenu, stabljikama) i zbog toga su sastavni deo ljudske ishrane. Fenoli su rasprostranjeni sastojci biljnih namirnica (voće, povrće, žitarice, masline, mahunarke, čokolada, itd.) i napitaka (čaj, kafa, pivo, vino, itd.) i delimično odgovorni za sveobuhvatna organoleptička svojstva biljne hrane. U biljkama su uključeni u odbranu od ultravioletnog zračenja ili napada patogena, parazita i grabljivica, a isto tako doprinose i bojama biljaka (Robbins, 2003).

U skorije vreme fenoli se smatraju moćnim antioksidansima *in vitro* i dokazano je da su moćniji antioksidanti od vitamina C i E i karotenoida (Rice-Evans, i sar. 1995; Rice-Evans, i sar. 1996). Inverzan odnos između unosa voća i povrća i bolesti koje su povezane sa rizikom od oksidativnog stresa kao što su kardiovaskularne bolesti, rak ili osteoporoza pripisan je fenolima (Hollman i Katan 1999; Scalbert i sar., 2005;). Predloženo je da fenolna jedinjenja antioksidantno dejstvo mogu da ispolje sledećim mehanizmima: neutralizacijom radikalnih vrsta kao što su ROS/RNS (tako što im doniraju H-atom),sprečavanjem stvaranja ROS/RNS, inhibiranjem nekih enzima ili helatnih metalnih čestica umešanih u stvaranje slobodnih radikala ili regulacijom antioksidantne odbrane (Cotelle, 2001).

Kao što je ranije pomenuto, naučna istraživanja su dokazala da fenoli veoma pozitivno utiču na zdravlje čoveka. Biološke aktivnosti kao što su antioksidantna, antimikrobna, antitumorska, stimulacija imunog sistema sposobnost modulacije enzima odgovornih za detoksifikaciju, i sposobnost modulacije hormonskog metabolizma su samo neke od odlike ovih jedinjenja. U nekim istraživanjima je dokazano da fenolna jedinjenja mogu da deluju vazoprotektivno, tako sto normalizuju krvni pritisak, sprečavaju zgrušavanje krvi i povećavaju elastičnost krvnih sudova. Osim toga, utiču i na metabolizam lipida sprečavanjem oksidacije LDL-holesterola, smanjenjem sinteze ili apsorpcije holesterola.. Značajnu ulogu ova jedinjenja imaju i u prevenciji dijabetesa (Robards i sar., 1999). Takođe, kao snažni antioksidanti, fenolna jedinjenja neutrališući slobodne radikale u ćelijama različitim mehanizmima, mogu da spreče oksidativna oštećenja DNK i širenje tumora (Ohshima i sar., 1998).

2.2.4. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću grupu biljnih fenola čiju osnovnu strukturu čini difenilpropan ($C_6C_3C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksi fenil) propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C prstena nastaje flavan iz kojeg se izvodi određeni broj osnovnih struktura (flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni). Svi mogu biti hidroksilovani i glikozilovani sa mono ili oligosaharidima (Kazazić, 2004).

Do sada je identifikovano više od 5000 flavonoida. Ovako veliki broj posledica je brojnih mogućih modifikacija njihove osnovne strukture, kao što su hidroksilacija, *O*-metilacija hidroksilnih grupa, dimerizacija i vezivanje neorganskog sulfata. Najbitinija modifikacija je glikozilacija hidroksilnih grupa (nastajanje *O*-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje *C*-glikozida; Harborne, 1989).i prisutni su u velikom broju viših biljaka. Nalaze se u različitim delovima mnogih biljaka (jabuke, citrusno voće, grožđe), naročito su prisutni u epidermisu lišća i koži plodova (Crozier i sar., 2009; Saxena i sar., 2013).

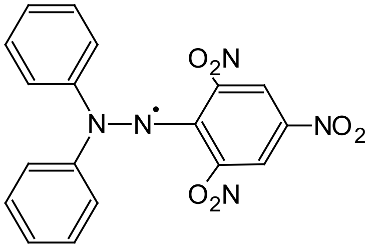
U biljkama flavonoidi obavljaju mnoge funkcije. Između ostalog, predstavljaju najvažnije biljne pigmente za bojenje cvetova, najčešće „izazivaju'' žutu ili plavo-crvenu pigmentaciju latica kako bi privukli insekte oprašivače. U višim biljkama, flavonoidi učestvuju u zaštiti od UV zračenja. Takođe mogu predstavljati hemijske glasnike, fiziološke regulatore i ćelijske ciklične inhibitore. Neki flavonoidi imaju inhibitornu ulogu prema organizmima koji mogu uzrokovati bolest biljke (Galleoti i sar., 2008).

Dosadašnja ispitivanja dokazala su veliki broj bioloških i farmakoloških aktivnosti koje poseduju flavonoidi. Sve klase ispoljavaju snažnu antioksidantnu aktivnost koja se manifestuje tako što deluju kao „skevindžeri“ kiseoničnih radikala kao što su $HO^•$, $O_2^{•-}$ ili lipidni radikali ($L^•$, $LO^•$ i $LOO^•$), kompleksiraju prelazne metale koji nastaju Fentonovom reakcijom ili pokazuju kooperativnostsa drugim antioksidantima (Apak i sar., 2007).

Osim antioksidantne aktivnosti, istraživanja pokazuju da flavonoidi poseduju još i anti-inflamatornu, antitumorsku, antiviralnu, antibakterijsku i antifungalnu aktivnost. Takođe su pokazali i blagotvorno dejstvo u tretmanu osteoporoze, tromboze i ateroskleroze. Mnogobrojne epidemiološke studije su pokazle da ishrana bogata flavonoidama pozitivno deluje na održavanje kognitivnih sposobnosti i prevenciju hipertenzije i kardiovaskularnih oboljenja (Agrawal, 2011).

2.2.5. Test neutralizacije DPPH radikala

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil; *Slika 2.1.*) predstavlja stabilan sintetički radikal koji je sposoban da reaguje sa vodonikom. Ima široku primenu u eksperimentima u kojima se određuje antioksidantna aktivnost prirodnih proizvoda. (Villano i sar., 2007). On se karakteriše kao stabilan slobodan radikal, jer poseduje delokalizovan nespareni elektron, tako da molekuli ne dimerizuju, za razliku od ostalih vrsta slobodnih radikala.



Slika 2.1. DPPH radikal

U reakciji rastvora DPPH sa supstancom koja može da donira vodonik, nastaje redukovani oblik ovog molekula, što je praćeno promenom boje. Ako DPPH radikal predstavimo kao $Z^{\cdot}$, a donorski molekul kao AH, primarna reakcija je:

$$Z^{\cdot} + AH \rightarrow ZH + A^{\cdot}$$

Ovde ZH predstavlja redukovanu formu, a $A^{\cdot}$ slobodni radikal koji je nastao u ovoj reakciji. Nastali radikal se zatim podvrgava daljim reakcijama koje kontrolišu sveukupnu stehiometriju. Stoga, ova reakcija čini vezu sa oksidativnim reakcijama, kao što su autooksidacija masti ili drugih nezasićenih supstanci. Tako $DPPH^{\cdot}$ ($Z^{\cdot}$) molekul predstavlja slobodan radikal koji je formiran u sistemu i čija aktivnost će biti potisnuta od strane AH (Molyneux, 2004).

Slobodni radikal $DPPH^{\cdot}$ sa nesparenim elektronom ima maksinum apsorpcije na 517nm (ljubičasta boja). U prisustvu vodonika kao donora elektrona $DPPH^{\cdot}$ se redukuje u DPPHH koji apsorbuje na manjim dužinama. Posledica toga je obezbojavanje (žuta boja), koje je proporcionalno koncentraciji prisutnih elektrona: veći stepen obezbojavanja označava veću redukcionu sposobnost. Kao mera stepena neutralizacije ovog radikala uzeta je IC_{50} vrednost, koja označava koncentraciju redukcionog sredstva (antioksidanta), koja je potrebna da se 50% DPPH radikala iz rastvora redukuje. Iz ovoga proizilazi da bolje antioksidantno dejstvo pokazuju supstance sa manjom IC_{50} vrednošću, odnosno potrebna je manja količina antioksidanta da bi se postigao isti efekat neutralizacije radikala.Apsorbancija DPPH radikala u metanolu i acetonu je smanjena pod dejstvom svetlosti

Ovu metodu je prvi put opisao Blois 1958. godine, a kasnije je modifikovana od strane brojnih istraživača. DPPH-test je brz, jednostavan i jeftin pa je široko rasprostranjena metoda merenja skevindžerske sposobnosti određenih supstanci, i procenjivanja antioksidantne aktivnosti hrane, primenom spektrofotometrije.

Posebno je pogodna za merenje ukupnog antioksidantnog kapaciteta voćnih i povrćnih sokova. DPPH-test se uspešno primenjuje i za ispitivanje antioksidantnih svojstava zrna pšenice, povrća, konjugovane linoleinske kiseline, lekovitog bilja, ulja i brašna (Nedić Grujin i sar., 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Priprema ekstrakata lišća

Biljni materijal je sakupljen tokom septembra i oktobra 2014. godine u vinogradima na području Fruške gore. U *Tabeli 3.1.* prikazani su osnovni podaci o lokalitetu i datumima sakupljanja ispitivanih uzoraka lišća različitih sorti vrste *Vitis vinifera* L.

Tabela 3.1. Podaci o uzorcima

Sorta	Lokalitet	Vinarija	Datum
Italijanski rizling	Sremski Karlovci	Podrum Bajilo	24.09.2014.
Cabernet Sauvignon	Sremski Karlovci	Podrum Bajilo	24.10.2014
Sila	Sremski Karlovci	Podrum Bajilo	26.09.2014.
Muskat Hamburg	Sremski Karlovci	Podrum Bajilo	29.09.2014.
Merlot	Sremska Kamenica	Podrum Šukac	06.10.2014.
Chardonnay	Sremski Karlovci	Podrum Došen	26.09.2014.
Frankovka	Sremski Karlovci	Podrum Vinum	03.10.2014.
Italijanski rizling	Sremska Kamenica	Podrum Agner	13.10.2014.
Župljanka	Sremska Kamenica	Podrum Agner	13.10.2014.

Priprema ekstrakata lišća svih navedenih vrsta urađena je po istoj proceduri. Biljni materijal je ostavljen oko 6 meseci u dobro provetrenoj prostoriji. Usitnjen suv biljni materijal preliven je sa 150 mL 80% metanola (MeOH) i maceriran 2h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka, biljni materijal je ponovo preliven istom količinom 80% MeOH i maceriran 2h uz mešanje. Postupak je ponovljen još 2 puta. Nakon toga je ekstrakt uparen na rotacionom vakuum uparivaču, a suvi ostatak sirovog ekstrakta rastvoren je u toploj destilovanoj vodi (10 mL destilovane vode/g suvog ostatka). U cilju uklanjanja nepolarnih komponenti, ovaj rastvor je ispran petrol-etrom (frakcija 40–60 ºC) do potpunog obezbojavanja petrol-etarskog sloja, a zatim uparen na rotacionom vakuum uparivaču. Suvi ostatak je zatim rastvoren u destilovanoj vodi i napravljen je osnovni rastvor koncentracije 200 mg/mL. U *Tabeli 3.2*. prikazani su odgovarajući prinosi prečišćenog, suvog ekstrakta.

Tabela 3.2. Prinosi metanolnih ekstrakata lišća ispitivanih sorti *V. vinifera*

Sorta	**Prinos (%)**
Italijanski rizling Bajilo	17.09
Cabernet Sauvignon	14.57
Sila	11.80
Muscat Hamburg	14.37
Merlot	16.22
Chardonnay	8.40
Frankovka	8.33
Italijanski rizling Agner	16.93
Župljanka	17.82

3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je po spektrofotometrijskoj metodi Singleton-a i saradnika (1999), prilagođenoj za mikro ploče. Ova metoda se zasniva na osobini fenola da u reakciji sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (smeša Na_2WO_4, Na_2MoO_4, HCl, H_3PO_4 i $LiSO_4$) daju obojeni kompleks, čija apsorbancija se meri na 760 nm.

Reagensi:

1. 0.1 mol/L Folin-Ciolcateu reagens (FC reagens): 1.25 mL 2M FC reagensa razblaženo destilovanom vodom do 25.0 mL
2. 75 g/L Na_2CO_3: 1.875 g Na_2CO_3 rastvoreno u 25.0 mL dH_20
3. 1 mg/mL galna kiselina: 0.0276 g galne kiseline × 1 H_2O rastvoreno u 25.0 mL dH_20

Razblaženja galne kiseline za standardnu krivu data su u *Tabeli 3.3*.

Tabela 3.3. Razblaženja galne kiseline korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija galne kis. (µg/mL)	80	60	50	40	30	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0
Zapremina osnovnog r. 1 mg/mL galne kis. (µL)	40	30	25	20	15	10	10	10	10	10	10	0
Zapremina vode (µL)	460	470	475	480	485	490	990	1990	3990	7990	16990	500

4. Početne koncentracije ispitivanih ekstrakata:
    - Ekstrakti lišća *Italijanskog rizlinga Bajilo, Cabernet Sauvignon*-a, *Sile, Muscat Hamburg*-a, *Merlot*-a, *Chardonnay*-a, *Frankovke, Italijanskog rizlinga Agner* i *Župljanke:* 0.625, 0.312 i 0.156 mg/mL.

Postupak:

Razblaženja galne kiseline za standardnu krivu su napravljena u rasponu koncentracije od 0.625 do 80 µg/mL. Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 0.156, 0.312 i 0.625 mg/mL. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja. Pripremljeni su rastvori prikazani u *Tabeli 3.4.*, a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (760 nm) nakon dva časa.

Tabela 3.4. Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja ukupnih fenola

Radna proba	**Korekcija**	**Slepa proba**	**Korekcija slepe probe**
30 µL ekstrakt	30 µL ekstrakt	30 µL rastvarač (dH_2O)	30 µL rastvarač (dH_2O)
150 µL 0.1 mol/L FC reagens	150 µL dH_2O	150 µL 0.1 mol/L FC reagens	150 µL dH_2O
120 µL 75 g/L Na_2CO_3*	120 µL 75 g/L Na_2CO_3*	120 µL 75 g/L Na_2CO_3*	120 µL 75 g/L Na_2CO_3*

* rastvor je dodat 10 min po dodatku FC reagensa

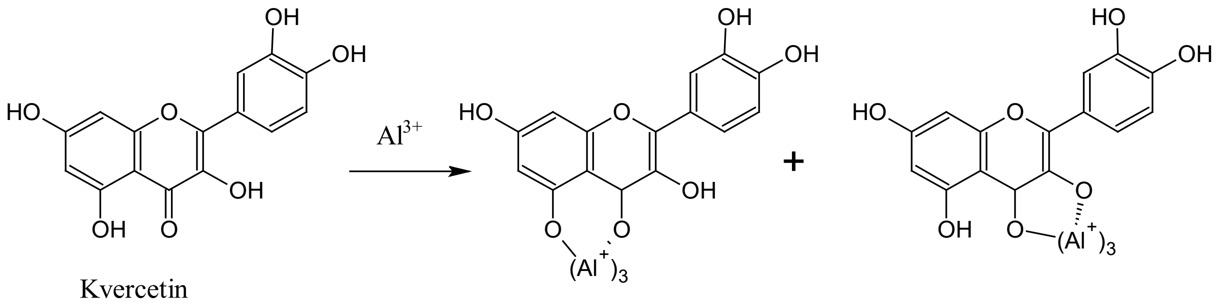
Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba (A_{sr}) i korekcije (A_{kor}) i slepe probe (A_{sp}) i korekcije slepe probe (A_{korsp}) izračunate su apsorbancije (A) za svaki ispitani ekstrakt:

$$A = (A_{sr} - A_{kor}) - (A_{sp} - A_{korsp})$$

Sadržaj fenola je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standarnog rastvora galne kiseline. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija (miligram-ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog ekstrakta).

3.3. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj flavonoida određen je po spektrofotometrijskoj metodi Chang-a i saradnika (2002), prilagođenoj za mikro ploče. Naime, flavonoidi i flavonglikozidi daju sa metalima odgovarajuće metalokomplekse. Naročito je značajan Al-kompleks (*Slika 3.1.)*, jer se Al^{3+} vezuje za ukupne flavonoide pa se sumarni apsorpcioni maksimum lako određuje.



Slika 3.1. Nastajanje obojenog kompleksa Al^{3+} jona i flavonoida

Reagensi:

1. 0.75 mol/L $AlCl_3$: 4.5266 g $AlCl_3 \times 6\ H_2O$ rastvoreno u 25.0 mL dH_20
2. 1 mol/L CH_3COONa: 3.402 g $CH_3COONa \times 3\ H_2O$ rastvoreno u 25.0 mL dH_20
3. 1 mg/mL Kvercetin: 0.0264 g kvercetin × H_2O rastvoreno u 25.0 mL 80% metanola

Razblaženja kvercetina za standardnu krivu data su u *Tabeli 3.5.*:

Tabela 3.5. Razblaženja kvercetina korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija kvercetina (µg/mL)	80	60	50	40	30	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0
Zapremina osnovnog rastvora 1 mg/mL kvercetina (µL)	40	30	25	20	15	10	10	10	10	10	10	0
Zapremina 80% metanola (µL)	460	470	475	480	485	490	990	1990	3990	7990	16990	500

4. Početne koncentracije ispitivanih ekstrakata:

- Ekstrakti lišća *Italijanskog rizlinga Bajilo, Sile, Muscat Hamburg*-a, *Merlot*-a*, Chardonnay*-a, *Italijanskog rizlinga Agner i Župljanke* 2.5, 1.25 i 0.313 mg/mL
- Ekstrakti lišća *Cabernet Sauvignon*-a *i Frankovke* 5, 2.5 i 1.25 mg/mL.

Postupak:

Razblaženja kvercetina za standardnu krivu su napravljena u rasponu koncentracije od 0.625 do 80.0 µg/mL. Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 0.313, 1.25 i 2.5 mg/mL i 1.25, 2.5 i 5 mg/mL. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja. Pripremljeni su rastvori prikazani u *Tabeli 3.7.*, a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (415 nm) nakon trideset minuta.

Tabela 3.6. Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja flavonoida

Radna proba	**Korekcija**	**Slepa proba**	**Korekcija slepe probe**
30 µL ekstrakt	30 µL ekstrakt	30 µL rastvarač (dH_2O)	30 µL rastvarač (dH_2O)
90 µL MeOH	90 µL MeOH	90 µL MeOH	90 µL MeOH
6 µL 0.75 mol/L $AlCl_3$	6 µL H_20	6 µL 0.75 mol/L $AlCl_3$	6 µL H_20
6 µL 1 mol/L CH_3COONa	6 µL 1 mol/L CH_3COONa	6 µL 1 mol/L CH_3COONa	6 µL 1 mol/L CH_3COONa
170 µL H_20	170 µL H_20	170 µL H_20	170 µL H_20

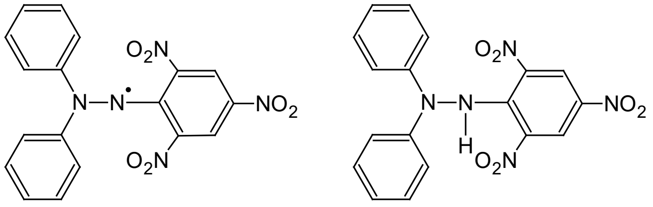
Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba (A_{sr}) i korekcije (A_{kor}) i slepe probe (A_{sp}) i korekcije slepe probe (A_{korsp}) izračunate su apsorbancije (A) za svaki ispitani ekstrakt:

$$A = (A_{sr} - A_{kor}) - (A_{sp} - A_{korsp})$$

Sadržaj flavonoida je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standarnog rastvora kvercetina. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija (miligram-ekvivalenata kvercetina po gramu suvog ekstrakta).

3.4. Određivanje neutralizacije DPPH radikala

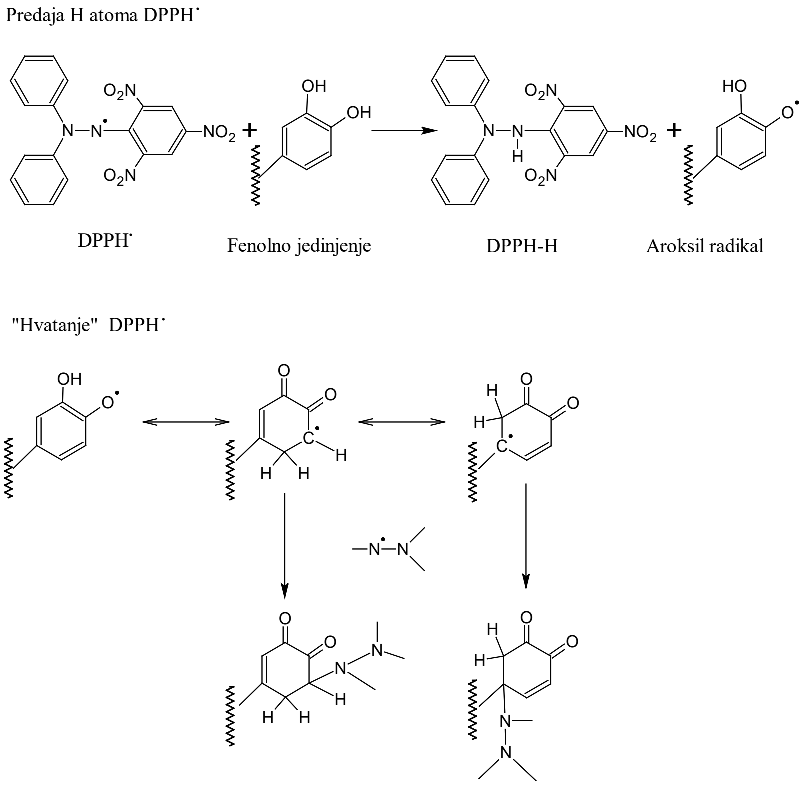
Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala urađeno je primenom spektrofotometrijske metode (Espin i sar., 2000), prilagođene za mikro ploče, koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu $DPPH^{\bullet}$ prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik (*Slika 3.2.*).


O_2N
N—N
NO_2
O_2N
H

DPPH$^{\bullet}$ radikal (ljubičast) DPPH-H (žut)

Slika 3.2. Radikalska i redukovana forma DPPH$^{\bullet}$

Neutralizacija DPPH$^{\bullet}$ fenolnim jedinjenjima odvija se pomoću dva simultana mehanizma. Najpre, fenolno jedinjenje deluje kao donor H-atoma pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan, a zatim, nastali ariloksil radikal može da reaguje sa još jednim DPPH radikalom pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i prelaska u neutralan molekul (*Slika 3.3.*).


Predaja H atoma DPPH˙
O_2N
NO_2
OH
HO
O˙
DPPH˙
Fenolno jedinjenje
DPPH-H
Aroksil radikal
"Hvatanje" DPPH˙
O
C˙
H
N
—N˙—N

Slika 3.3. Mehanizam neutralizacije DPPH$^{\bullet}$ pomoću fenolnih jedinjenja

Reagensi:

1. 3 mmol/L DPPH$^\bullet$ u etanolu - osnovni rastvor DPPH$^\bullet$ reagensa: 0.0118 g DPPH$^\bullet$ rastvoreno (ultrazvučno kupatilo) u 10 mL etanola (rastvor je čuvan u tamnoj boci na 4ºC, stabilan 14 dana)
2. 90 µmol/L DPPH$^\bullet$ u metanolu - radni rastvor DPPH$^\bullet$ reagensa: 562.5 µL osnovnog rastvora dopunjeno do 25 mL metanolom (rastvor je pripremljen na dan merenja)
3. Početne koncentracije ispitivanih uzoraka
    - ekstrakata lišća:
        - *Italijanskog rizlinga Bajilo, , Sile, Muscat Hamburg-* a, *Italijanskog rizlinga Agner* i *Župljanke*: 10.00, 5.00, 2.50, 1.25, 0.625, 0.313, 0.0156mg/mL
        - *Cabernet Sauvignon-a, Frankovke i Chardonnay-a:* 1.250, 1.000, 0.625, 0.500, 0.250, 0.125, 0.063 mg/mL; i
        - *Merlot-a:* 0.625, 0.500, 0.375, 0.250, 0.125, 0.063, 0.031 mg/mL
    - standarda:
        - propil galata (PG) i 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilne kiseline (Trolox) : 0.200, 0.100, 0.050, 0.025, 0.013, 0.006, 0.003 mg/mL
        - butilovani hidroksitoluen (BHT): 5.000, 2.500, 1.250, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 mg/mL

Postupak:

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL napravljena je serija sedam rastvora dvostrukih razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta (0.01625-10 mg/mL; 0.063-1.25 mg/mL i 0.031-0.625 mg/mL), u zavisnosti od vrste ekstrakta. Početne koncentracije korišćene za standardne antioksidante su 0.003125-0.2mg/mL za PG, 0.078125-5mg/mL za BHT, odnosno 0.003125 mg/mL za Trolox. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su rastvori prikazani u Tabeli 3.7. a njihova apsorbancija je merena spektrofotometrijski (515 nm) nakon 60 min uz razvijanje boje u mraku.

Tabela 3.7. Rastvori pripremljeni za određivanje neutralizacije $DPPH^{\bullet}$ radikala pri ispitivanju ekstrakata i standarda

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Slepa proba
100 µL 90 µmol/L $DPPH^{\bullet}$	100 µL MeOH	100 µL 90 µmol/L $DPPH^{\bullet}$	100 µL MeOH
10 µL ekstrakt/standarda	10 µL ekstrakt/standarda	10 µL rastvarač (d H_2O)	10 µL rastvarač (d H_2O)
190 µL MeOH	190 µL MeOH	190 µL MeOH	190 µL MeOH

Iz razlike apsorbancije radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbancije (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

Kapacitet „hvatanja“ slobodnih (DPPH) radikala (RSC, *radical scavenging capacity*) ekstrakata i etarskih ulja različitih koncentracija (RSC_{DPPH}) je računat na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbancija kontrolne, a A_{sp} apsorbancija slepe probe:

$$RSC_{DPPH^{\bullet}} (\%) = (1 - A/(A_{kon} - A_{sp})) \times 100\%$$

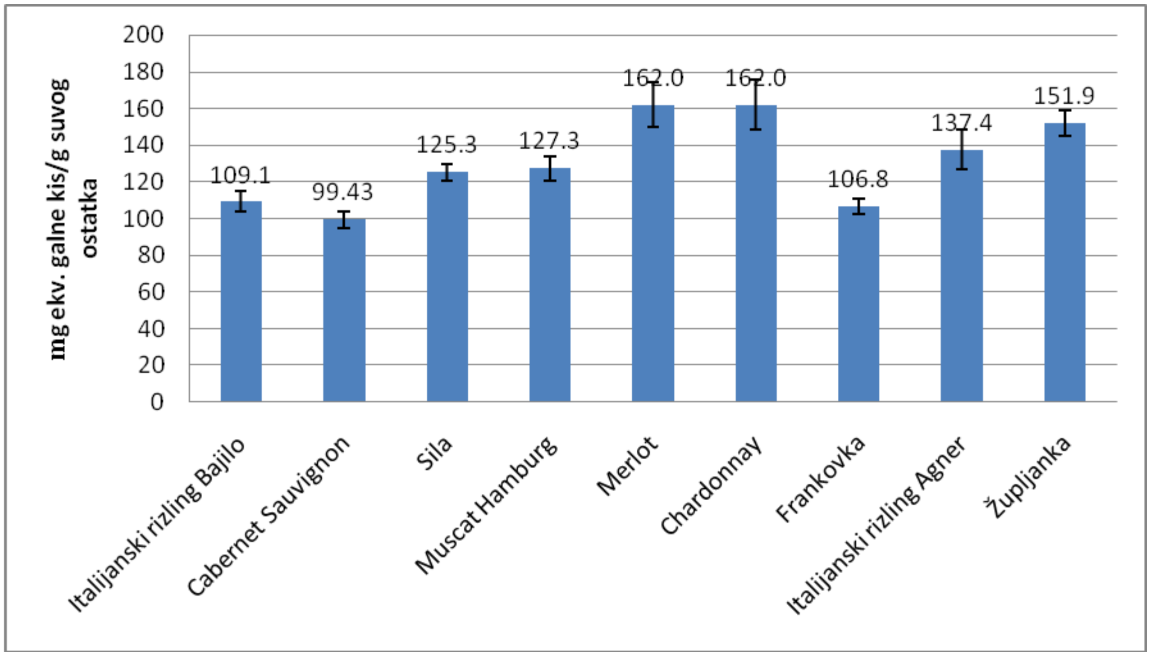
Na osnovu $RSC_{DPPH^{\bullet}}$ vrednosti određene su IC_{50} vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutrlisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija $RSC_{DPPH^{\bullet}}$ (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti ± standardna devijacija (µg/mL).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu ispitan je antioksidantni potencijal ekstrakata lišća vinove loze primenom DPPH testa. Takođe, određen je ukupan sadržaj fenola i flavonoida, u cilju određivanja korelacije sa antioksidantnim potencijalom uzoraka.Tabele sa podacima pomoću kojih su konstruisani grafici, kao i sami grafici, su prikazani u *Prilogu* (Poglavlje 7.)

4.1. Ukupni fenoli

Na *Histogramu 4.1.* prikazan je ukupan sadržaj fenola u ispitivanim ekstraktima izražen u mg ekvivalenata galne kiseline/g suvog ekstrakta. Prikazani rezultati ukazuju da je lišće vrste *V. vinifera* dobar izvor fenolnih jedinjenja. Naime, može se zapaziti da sve ispitivane sorte imaju visok sadržaj fenola u rasponu od 99.43 mg ekv. galne kis/g suvog ekstrakta (*Cabernet Sauvignon*) do 162 mg ekv. galne kis/g suvog ekstrakta (*Merlot* i *Chardonnay*)



Histogram 4.1. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima

Za razliku od plodova vinove loze, gde se jasno može uočiti razlika u sadržaju fenola između crvenih i belih sorti (Fernandes i sar., 2013), odnosno gde su crvene sorte znantno bogatije fenolima od belih sorti, kod lišća se ne može ustanoviti jasna korelacija. Na primer *Merot,* koji je crna sorta i *Chardonnay,* koji je bela, imaju jednak sadržaj fenola u lišću. Takođe i *Muscat Hamburg* (crvena sorta) i *Sila (*bela sorta), imaju približan sadržaj fenola svojim listovima. Poređenjem sa ranije objavljenim rezultatima, može se zaključiti da geografski položaj gajenja neke vrste ne uzrokuje nužno razliku u sadržaju fenola. Naime, na osnovu rezultata prikazanih u istraživanju Katalinić i saradnika iz 2013. godine, koji su ispitivali sadržaj fenola u lišću nekih dalmatinskih sorti vinove loze, ne uočava se neka signifikantna razlika u odnosu na fruškogorske sorte ispitivane u ovom radu. Kao konkretna veza između ova dva istraživanja, može se uzeti sorta *Merlot,* gde je sadržaj fenola u lišću dalmatinskog *Merlot*-a, reda veličine sa sadržajem fruškogorskog. Tačnije, *Merlot* se u oba slučaja pokazao kao sorta najbogatija fenolima u odnosu na ostale ispitivane sorte. Abramovič i saradnici (2012) su, takođe, došli do sličnih podataka za sadržaj fenola u ekstraktu lišća sorte *Merlot* (168.2±1.3 mg ekv gal kis/g suvog ekstrakta), dok u našem istraživanju ovaj podatak iznosi 162 mg ekv galne kis/g suvog ostatka.

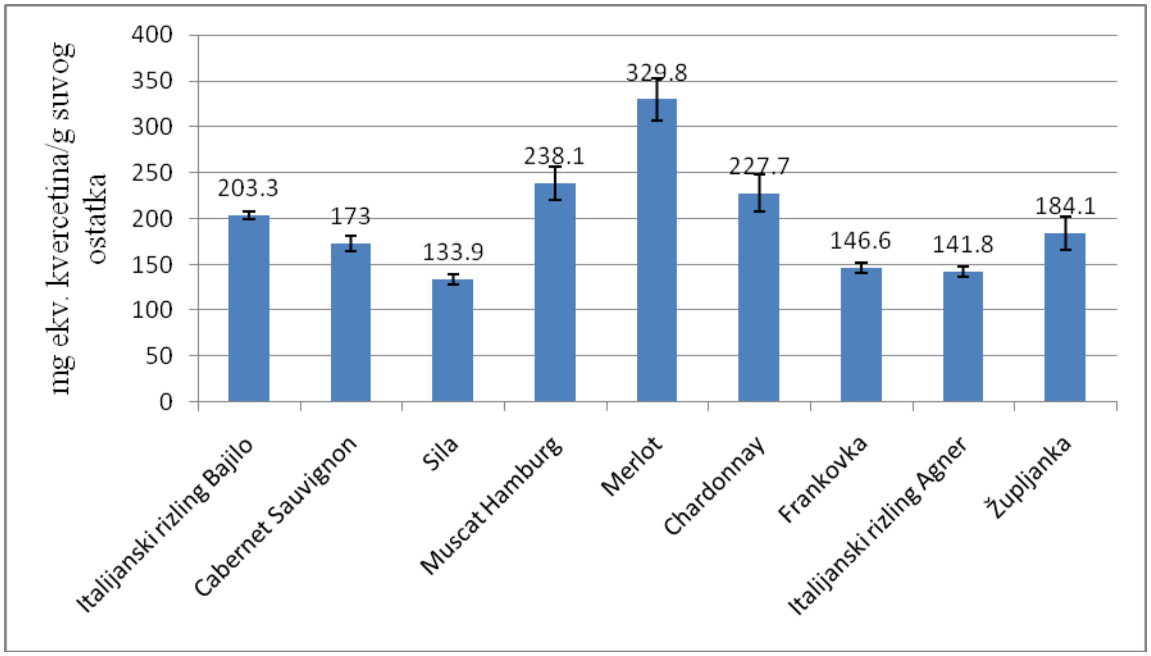
Fernandes i saradnici (2013) su ispitivali 9 belih sort ii 11 crvenih, među kojima su bili i *Chardonnay* (bela sorta) i *Merlot* (crvena sorta). Dok je sadržaj fenola u lišću *Chardonnay*-a (193±13 mg ekv galne kis/g suvog ostatka) bio približan vrednosti dobijenoj u našem istraživanju, dok se sadržaj fenola određen u lišću *Merlot*-a sa područja Portugala znatno razlikovao (347±32 mg ekv galne kis/g suvog ostatka)

Sadržaj fenola u najvećoj meri zavisi od sorte koja se ispituje, što se jasno može uočiti sa histograma. Međutim, još neki faktori utiču na sadržaj fenola kao što su negativni ekološki uslovi, odnosno tolerantnost određene sorte vinove loze prema tim uslovima. Tako su Vincent i saradnici (2007) ustanovili da sorta *Chardonnay* ima veću šansu da opstane u sušnim uslovima, i na zemljištu povećanog salinitieta nego što je to slučaj sa sortom *Cabernet Sauvignon.* Takođe, Król i saradnici (2015) su na osnovu svog istraživanja zaključili da sorte koje bolje podnose hladnoću imaju veći sadržaj fenola u svojim listovima. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da *Chardonnay* bolje podnosi i niske temperature od sorte *Cabernet Sauvignon.*

4.2. Ukupni flavonoidi

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je po po postupku koji je opisan u *Poglavlju 3.4.* Odnosno, na osnovu veličine izmerenih apsorbancija ispitivanih ekstrakata sa kalibracione krive su očitane vrednosti za koncentraciju kvercetina, a zatim je izračunat sadržaj flavonoida (srednja vrednost rezultata sve tri koncentracije) u svim uzorcima. Rezultat je izražen kao vrednost mg ekvivalenata kvercetina/g suvog ekstrakta. U *Prilogu* su prikazani odgovarajući grafici i tabele.

Na *Histogramu 4.2.* prikazan je ukupan sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima izražen u mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta.



Histogram 4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima izražen u mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta

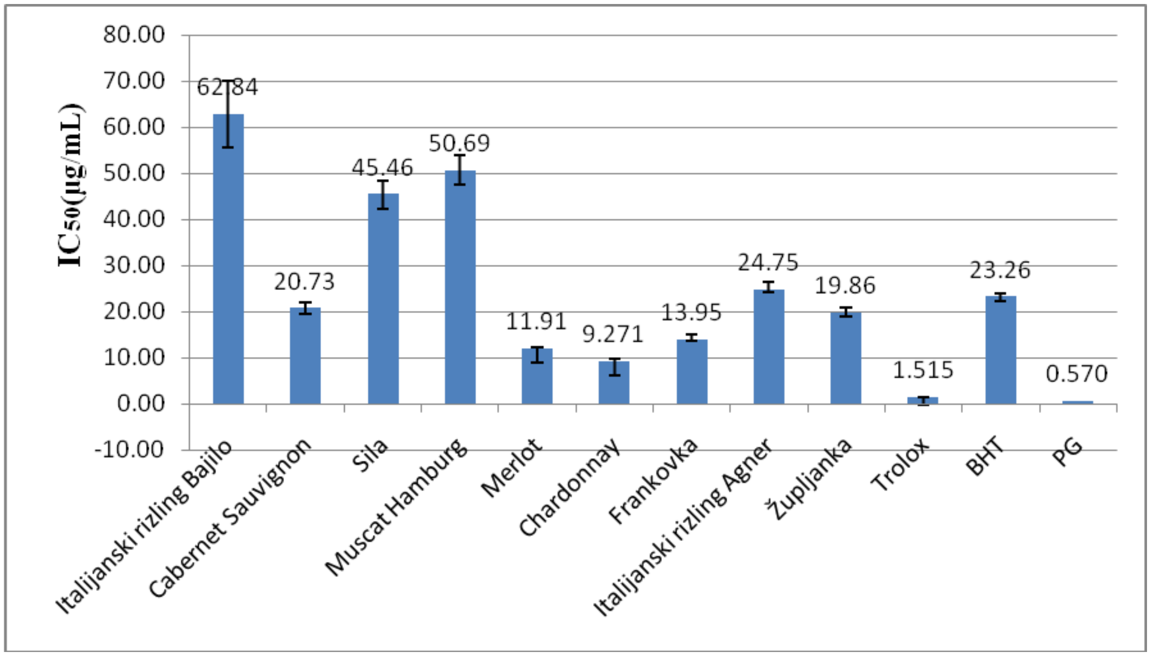
Rezultati na ovom histogramu ukazaju na to da je lišće različitih sorti vinove loze veoma bogato flavonoidima. Poredeći ispitivane ekstrakte, može se uočiti da ubedljivo najveći sadržaj flavonoida ima ekstrakt sorte vinove loze *Merlot* (329.8 mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta), dok je najmanja količina ovih jedinjenja detektovana u ekstraktu *Sila* (133.9 mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta). Sične rezultate za sadržaj flavonoida u lišću različitih sorti *V. vinifera* L. dobili su i Orhan i saradnici (2009). Oni su takođe ustanovili da sorte koje imaju visok sadržaj fenola, takođe imaju i visok sadržaj flavonoida u ekstraktima lišća. U istraživanju Katalinić i saradnika (2013) može se primetiti bitna razlika u sadržaju flavonoida lišću sorti koje su ubrane maju i onih ubranih u septembru. Kod nekih vrsta, kao što je *Merlot*, uočeno je povećanje sadržaja flavonoida oko 3 puta (majsko lišće=6.5±0.3 g ekv. galne kiseline/L; Septembarsko lišće=17.8±0.9 g ekv. galne kis/L).U istaživanju Króla i saradnika (2015), ustanovljeno je da sorte koje bolje podnose zimu, sadrže veću koncentraciju flavonoida u ekstraktima lišća.

4.3. Neutralizacija DPPH radikala

Određivanje potencijala neutralizacije DPPH radikala se često koristi u proceni antioksidantne aktivnosti. Najveće prednsti ove u odnosu na druge metode ispitivanja antioksidantnog potencijala su velike jednostavnost, brzina i komercijalna dostupnost DPPH radikala.

Procenti inhibicije DPPH radikala izračunati su na osnovu izmerenih apsorbancija ispitivanih uzoraka (*Tabela 7.5.-7.13.*), po postupku opisanom u *Poglavlju 3.2.*, konstruisane su krive zavisnosti odgovora ($RSC_{DPPH^{\cdot}}$) od radne koncentracije i očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do neutralizacije 50% DPPH radikala (*Grafik 7.3.-7.11.*). Kao referentne supstance pod istim uslovima korišćeni su butilovani hidroksi toluen (BHT), propil galat (PG) i 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) koji su sintetički antioksidanti (*Tabela 7.14.,7.15. i 7.16.*; *Grafik 7.12., 7.13. i 7.14.*).

Na *Histogramu 4.3.* prikazani su rezultati ispitivanja aktivnosti ekstrakata lišća i standardnih antioksidntnih jedinjenja različitih sorti vinove loze pri neutralizaciji DPPH radikala (kapacitet „hvatanja“).



Histogram 4.3. Potencijal neutralizacije DPPH radikala uzoraka izražen kao IC50 vrednosti u µg/mL

Ispitivani ekstrakti lišća različitih sorti vinove loze postižu neutralizaciju 50% DPPH˙ radikala u opsegu koncentracijaod 9.271 µg/mL (*Chardonnay*) do 62.84 µg/mL (*Italijanski rizling Bajilo*). Pored ekstrakata *Chardonnay*, koji je u ovom testu ispoljio najveći antioksidantni potencijal i ekstrakti *Merlot* i *Frankovka* su pokazali veoma dobru sposobnost neutralizacije DPPH˙ radikala (IC50 vrednost 11.91 µg/mL i 13.95 µg/mL). U poređenju sa ispitanim sintetičkim antioksidantima, ekstrakti su pokazali odličnu redukcionu sposobnost . Pa je tako u poređenju sa BHT, čak 5 vrsta pokazalo bolji antioksidantni kapacitet (*Cabernet sauvignon, Merlot, Chardonnay, Frankovka i Župljanka).* Ipak, u odnosu na preostala dva sintetička antioksidanta (*Trolox i PG),* sve vrste su ispoljile slabiju aktivnost. Međutim, ako se uzmu u obzir istraživanja koja su pokazala da postoji određena veza između unošenja PG i BHT putem hrane i karcinogeneze (Hirose i sar., 1993), dobijeni rezultati opravdavaju primenu lišća vinove loze u antioksidantne svrhe. Katalinić i sar (2013) su takođe ispitivali antioksidantnu aktivnost lišća vinove loze i to 6 sorti (4 crvene i 2 bele), među kojima je i *Merlot.* Kao što je to slučaj i sa našim istraživanjem, i u ovom radu je ekstrakt lišća sorte *Merlot* pokazao bolju sposobnost neutralizacije u odnosu na druge ispitivane ekstrakte.

Određena korelacija između boje bobica vinove loze i antioksidantne aktivnosti lišća se ne može sa pouzdanošću odrediti, jer najveća IC_{50} i najmanja IC_{50} potiču od ekstrakata lišća belih sorti (*Italijanski rizling Bajilo* i *Chardonnay*). Isti slučaj je i sa rezultatima rada Katalinić i saradnika gde bela sorta *Pošip* pokazuje sličnu antioksidantnu vrednost kao crvena sorta *Lasin.*

Fernandes i saradnici (2013) su ispitivali potencijal neutralizacije DPPH radikalakod 9 belih i 11 crvenih sorti vinove loze sa područja severoistočnog Portugala. Među ovim sortama su bile i *Chardonnay* (bela sorta) i *Merlot* (crvena sorta). Dok je od belih sorti najbolju antioksidantnu sposobnost pokazao upravo *Chardonnay*, *Merlot* je pokazao drugu najlošiju antioksidantnu aktivnost u konkurenciji crvenih sorti. Iz ovog istraživanja bi se mogla dati blaga prednost belim sortama, u antioksidantnim aktivnostima.

U radu Orhana i saradnika iz 2008. je pokazano da etanol-acetatna frakcija vodenog ekstrakta lišća V. vinifera L. ima najbolju DPPH skevindžersku aktivnost u konkurenciji još n-butanolne i 3-hlor-metanske frakcije.

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori između ukupnog sadržaja fenola odnosno flavonoida i antioksidantne aktivnosti, izražene kao recipročne vrednosti dobijenih IC_{50} vrednosti. Vrednosti korelacionih faktora prikazani su u *Tabeli 4.1.*

Tabela 4.1. Korelacioni faktori između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i antioksidantne aktivnosti

Korelacioni faktor (R^2)	
	Potencijal hvatanja DPPH$^{\cdot}$
Ukupni fenoli	0.809
Ukupni flavonoidi	0.783

Regresiona analiza primenjena na dobijene rezultate antioksidantne aktivnosti ekstrakata lišća ispitivanih sorti vinove loze pokazuje da sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima korelira sa sposobnošću neutralizacije DPPH$^{\cdot}$ radikala (R^2=0.809), što ukazuje na to da pri neutralizaciji ovih slobodnih radikalskih vrsta, fenolna jedinjenja imaju značajnu, ali ne i ključnu ulogu. Dobijen niži korelacioni faktor (0.783) za ukupne flavonoide ukazuje da ova jedinjenja utiču u manjoj meri na reakciju neutralizacije ispitivane radikalske vrste, tj. da nisu u direktnoj korelaciji. Rezultati Katalinića i saradnika su u skladu sa ovim rezultatima. Naime, oni su zaključili da lišće ubrano u maju ima znatno veći sadržaj fenolnih jedinjenja odlišća ubranog u avgustu i septembru, a da istovremenom poseduje i najbolju sposobnost neutralizacije DPPH radikala. Ipak ova razlika u aktivnosti nije toliko uočljiva, pa se ne može pripisati isključivo različitoj koncentraciji fenolnih komponenti u ova tri slučaja, već se smatra da je antioksidantna aktivnost rezultat zajedničkog dejstva i fenolnih komponenti i nekih drugih komponenti u ekstraktu.

Na osnovu ispitivanja antioksidantne aktivnosti, može se zaključiti da ekstrakti lišća različitih sorti vinove loze poseduju dobru antioksidantnu aktivnost, a kao najbolji izdvajaju ekstrakti lišća sorti *Merlot* i *Chardonnay*. Osim ovih ekstrakata, pri neutralizaciji DPPH radikala čak petekstrakata sorti vinove loze (*Merlot, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Frankovka i Župljanka*) je pokazalo bolju aktivnost u odnosu na sintetički antioksidanta, BHT. Takođe, ekstrakti lišća različitih sorti vinove loze su veoma bogat izvor fenola i flavonoida, pri čemu je najviši sadržaj ovij jedinjnaja detektovan u ekstraktima sorte *Merlot* i *Chardonnay*.

Takođe, korelacija između ukupnog sadržaja fenola i skevindžerske sposobnosti se može lako uočiti, pa su tako dve sorte sa najvećim sadržajem fenola (*Merlot* i *Chardonnay)* najbolji skevindžeri DPPH radikala. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije objavljenimSa ovom činjenicom se slažu i Katalinić i sar. (2013).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem ekstrakata lišća sorti *Italijanski rizling Bajilo, Cabernet Sauvignon, Sila, Muscat Hamburg, Merlot, Chardonnay, Frankovka, Italijanski rizling Agner i Župljanka* iz vinograda Fruške gore*,* može se zaključiti da su ovi uzorci bogati fenolnim jedinjenjima. Najbogatiji fenolima su ekstrakti lišća sorti *Merlot* i *Chardonnay.* Sadržaj flavonoida u ekstraktima je nešto niži, a sorta sa najvećom količinom flavonoida u svom lišću je *Merlot.* Na osnovu dobijenih rezultata, ne može se ustanoviti veza između sadržaja ovih jedinjenja i boje sorti. Korelacioni faktor, izračunat na kraju rada, ukazuje da su nosioci antioksidantne aktivnosti lišća vinove loze upravo fenoli, dok se za flavonoide može reći da daju velik doprinos ovoj aktivnosti.

Pojedini uzorci pokazali su izuzetan potencijal u neutralizaciji DPPH radikala. Najveću antioksidantnu aktivnost pokazale su sorte *Merlot* i *Chardonnay.* Međutim, u poređenju sa antioksidantnom aktivnošću sintetičkih antioksidanata *PG* i *Trolox*, sorte su generalno pokazale slabiju antioksidantnu aktivnost. Ipak, pet sorti vinove loze (*Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Frankovka* i *Župljanka*) je pokazalo bolju DPPH skevindžersku sposobnost od sintetičkog antioksidanta *BHT.* Ukoliko se zna da sintetički antioksidanti mogu izazvati neke štetne posledice po čovekovo zdravlje, može se zaključiti da lišće vinove loze treba ozbiljno uzeti u razmatranje zarad budućeg korišćenja, kako u ishrani tako i u medicinske svrhe.

6. Literatura

Abramovič, H., Terpinc, P., Generalić, I., Skroza, D., Klančink, A., Katalinić, V., Možina, S.S. (2012): Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. *Croatian Journal of Food Science and Technology.* Volume 4. pp. 1-8

- Agrawal, A. D., (2011): Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Siences and Nanotechnology.* Volume 4, Issue 2, pp. 1394-1398.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. (2007): Compa*rative Eval*uation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules.* 12: 1496-1547.
- Aradhya, M., Koehmstedt, A., Prins, B. H., Dangl, G. S., & Stover, E. (2007, October). Genetic structure, differentiation, and phylogeny of the genus Vitis: implications for genetic conservation. In *V International Symposium on the Taxonomy of Cultivated Plants* 799 :. 43-49.Aron, P.M., Kennedy, J.A (2008): Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research.* 52: 79-104.
- Bagchi, K., Puri, S., (1998). Free radicals and anti oxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Journal* ; 4 : 350 – 60 .
- Balasubramanian, B.; Pogozelski, W.K.; Tullius, T.D. (1998). "DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95** (17): 9738–9743. *doi:10.1073/pnas.95.17.9738*
- Blois, M.S.,1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*.29:1199-1200
- Bombardelli, E., Morazzoni, P. (1995): Vitis vinifera L., Fitoterapia, 66, 291-317
- C*antos,* E., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. (2002): Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50: 5691-5696

- Chacona, M.R., Ceperuelo-Mallafrea, V., Maymo-Masipa, E., Mateo-Sanzb, J.M., Arolac, L., Guitierreza, C., Fernandez-Reald, J.M., Ardevolc, A., Simona, I., Vendrella, J. (2009): Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes *in vitro*. *Cytokine*. 47: 137-142.
- Cheeseman, K.H., Slater T.F. (1993): An introduction to free radicals chemistry. *British Medical Bulleetin* 49:481–93.
- Cheynier, V.; Comte, G.; Davies, K.M.; Lattanazio, V.; Martens, S. (2013): Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 72, p. 1-20.
- Cindrić P. (1990): *Sorte vinove loze,* Nolit, Beograd
- Cotelle, N. (2001): Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*., 1: 569-590.
- Crozier, A., Jaganath, B.I., Clifford, N.M. (2009): Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports.* 26: 965-1096.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Agostini, F., Funchal, C., Serafini, L., Henriques, J.A., Salvador M.
- Ebadi M. (2001): Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. *Arizona: Prominent Press*. 23: 198-203
- Eftehari, M., Alizadeh, M., Ebrahimi, P. (2012): Evaluation of the total phenolics and quercetin content of foliage in mycorrhizal grape *(Vitis vinifera L.)* varieties and effects of postharvest drying on quercetin yield. *Industrial Crops and Products*. 38: 160-65.
- Felicio J.D., Santos R.S., Goncalez E. (2001): Chemical constituents from Vitis vinifera (Vitaceae). *Arquivos do Instituto Biológico*. 68: 47-50
- Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentâo, P., Andrade, P., Bento, A., Pereira, *A.J. (2013): Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products.* 43: 434-440.
- Galleoti, F; Barile, E; Curir, P; Dolci, M; Lanzotti, V (2008). "Flavonoids from carnation (Dianthus caryophyllus) and their antifungal activity". *Phytochemistry Letters*. **1**: 44–48. doi:10.1016/j.phytol.2007.10.001

- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A. (2010): Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*. 15: 4324-4333.
- Ghazemzadeh, A., Ghazemzadeh, N. (2011): Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research.* 5: 6697-6703.
- Griffiths, H.R., Lunec, J. (1989): The effects of oxygen free radicals on the carbonhydrate moiety of IgG. *FEBS Letters*. **245**: 95-99
- Haliwell B, Kaur H, Ingelman-Sundberg M. (1991): Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note, *Free Radical and Biology Medicine*; (6): 439-41.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1999): Free *Radicals in Biology and Medicine 3rd ed.,* New York: Oxford University Press, Oxford; 140-84.
- Harborne, J.B. (1976): *Functions of flavonoids in plants. In Chemistry and biochemistry of plant pigments*, ed. T.W. Goodwin, New York: Academic press, pp. 736-778.
- Hardie, W. J. (2000): Grapevine biology and adaptation to viticulture. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6: . 74–81
- Harman, D. (1993): Free radical involvement in ageing: Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Ageing*, 3: 60-80.
- He, F., Liang, N., Mu, L., Pan H,-Q., Wang, J., Reeves, J.M., Duan, J,-Q. (2012): Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules.* 17: 1571-1601.
- Hebash, K.A.H., Fadel, H.M., Soliman, M.M.A. (1991): Volatile components of grape leaves. *Journal of the International AIDS Society.* 4(1): 26-28.
- Heredia, F.J., Francia-Aricha, E.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Vicario, I.M., Santos-Buelga, C. (1998): Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect. *Food Chemistry*. 63, 491-498.
- Hirose, L., Masao, M., Bullardi, M., Hofner, B. (1993): "Modification of carcinogenesis by α-tocopherol, t-butylhydro-quinone, propyl gallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model." *Carcinogenesis*. 11 : 2359-2364.

- Hollman, P.C.; Katan, M.B. (1999): Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. 37, 937-942
- http://www.prodavnica.vino.rs/roze/roze/sila-rittium - 6.10.2016.
- http://www.vinarijakovacevic.co.rs/sardone.html – 6.10.2016.
- http://www.vino.rs/svet-vina/vrste/crvena/item/251-merlot.html - 6.10.2016.
- http://www.vinumlodi.rs/vino/cabernet-sauvignon - 6.10.2016.
- http://www.vinumlodi.rs/vino/italijanski-rizling - 6.10.2016.
- http://www.vinumlodi.rs/vino/%C5%BEupljanka - 6.10.2016.
- https://en.wikipedia.org/wiki/Vitis-20.08.2016
- Jing, S. X. (1999): Grape Classification and Germplasm Resources. In Grape Science, 1st ed.; He, P.C., Ed.; *China Agricultural Press*: Beijing, China; pp. 8–32.
- Josifović, M. (1972): *Flora Srbije*. Srpska akademija nauka i umetnosti Beograd.
- Katalinić, V., Generalić, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Teskera, A., Konta, I., Boban, M. (2009): Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology.* **2,** 7-15.
- Katalinic, V., Mozina, S.S., Generalic, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Klancnik, A. (2013): Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties.* **16**: 45-60.
- Kazazić, S.P., 2004: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 55, 279.290.
- Keller, M. (2010): *The science of grapevines*, Academic Press, California, Usa.
- Kovacic, P., Jacintho, J.D. (2001): Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry*, 8 ,pp. 773–796
- Kuljančić, D. I. (2007): *Vinogradarstvo,* Prometej, Novi Sad
- Król, A., Amarowicz, R., Weidner, S. (2015): The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinífera* L.) leaves. *Journal of Plant Phisiology.* **189:** 97-104.
- Lardos, A., Kreuter, M.H. (2000): Red vine leaf. Ed. by Dr. M. H. Kreuter, and Flachsmann AG, Zurich: Switzerland: *Intercity Pharmaceuticals and Extracts*, pp. 1-7. Dostupno na: http://www.askic.co.jp/vitisvinifera/vitis-vinifera-Full-article.htm.

- Leucuta, S.E., Vlase, L. (2006): Pharmacokinetics and metabolic drug interactions. *Current Clinical Pharmacology*. **1:** 5-20.
- Liu, T., Stern, A., Roberts, L.J., Morrow J.D. (1999): The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Journal of Biomedical Science*. **6.**, 226-235
- Longobottom, M. L., Dry, P. R., Sedgley, M. (2008): Observations on the morphology and development of star flowers of Vitis Vinifera L. cvs Chardonay and Shirax. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 14, 203-210.
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T. (2009): Early Earth: Oxygen for heavy-metal fans. *Nature.* 461: 179-181.
- Mathai, K. (2000): *Nutrition in the adult years. In Krause's food, nutrition, and diet therapy*, 10th ed., ed. L.K. Mahan and S. Escott-Stump. 271: 274-275.
- Mazza, G., Francis, F.J. (1995): Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 35: 341-371.
- McGovern, P.E. (2003): *Ancient Wine. The Search for the Origins of Viniculture*, Princeton University Press, Princeton, NJ
- Milosavljević, M. (1998): *Biotehnika vinove loze.* Beograd, 5, 200, 202, 206, 219, 221
- Molyneux, P. (2004): The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology.* 26(2): 211-219
- Monagas, M., Hernandez-Ledesma, B., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B. (2006): Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: Antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **54**: 319-327.
- Montvale NJ. (2002): *PDR for Herbal Medicines.* 2 nd ed. Medical Economics. New Jersey: pp. 362–363.
- Mullins, M.G. , Bouquet, A. , Williams, L.E. (1992): Biology of the Grapevine, *Cambridge University Press*, Cambridge, UK
- Nedić Grujin, K., Dimić, E., Kesić, M., Škrbić, J., Muc, S., Parenta, G., Gardinovački, Z. (2015): Promene kvaliteta, nutritivne vrednosti i održivosti ulja suncokreta tokom rafinacije. *Journal of Edible Oil Industry.* 46: 3-11

- Negrul, A.M. (1936): Variabilität und Vererbung des Geschlechts bei der Rebe. *Gartenbauwissenschaft*, 10 :. 215–231
- Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilbert I., (1998): Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion, *Free Radical Biology and Medicine*, 25, 1057-1065.
- Orhan, D.D., Orhan, N., Ozcelik, B., Ergun, F. (2009): Biological activities of Vitis vinifera L. leaves, *Turkish Journal of Biol*ogy. 33, 6-17.
- Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D.D., Ergun, F., Yeşilada, E. (2006): In-vivo assessement of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera)* in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology.***108**: 280-286.
- Patel, R.M., Patel N.J. (2011): *In vitro* antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 1, 52-68.
- Rechner A.R., Kroner C. (2005): Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research*. 116: 327-334.
- Repetto, M., Semprine, J., Boveris, A. (2012): *Lipid Peroxidation* (Edited by Angela Catala). InTech, Rijeka, Croatia.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Bolwell, P.G.; Bramley, P.M.; Pridham, J.B. (1995): The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research.* 22, 375-383.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J. Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine.* 20, 933-956.
- Ridnour, L.A. , Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., D.D. Roberts, D.D.. (2005): Wink Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* United States *of America*, **102** , pp. 13147–13152
- Rimbach G, Hohler D, Fischer A, (1999): Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv für Tierernährung* ; 52 (3): 203-22
- Robards K., Prenzer P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry.* 66: 401-436.

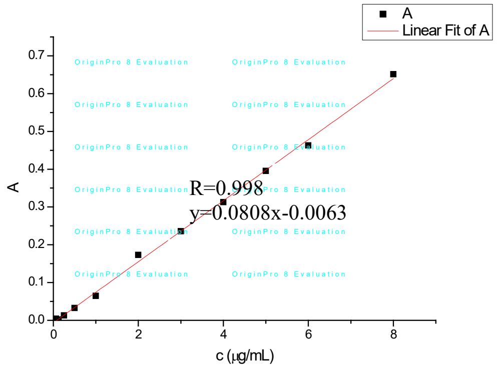
- Robbins, J.R. (2003): Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51: 2866-2887.
- Ronald S. Jackson (2014.): *Wine Science (Principles and Applications).* Academic Press, London, UK.
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., Gupta, A. (2013): Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognozy and Phytochemistry.* 1: 168-182.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 45, 287-306
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B. (2010): Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* **3**: 91-100.
- Şendoğdu, N. Aslan, M., Orhan, D.D., Ergun, F., Yeşilada, E. (2006): Anidiabetic and antioxidant effects of *Vitis vinifera* L. leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Turkish Journal of Pharmacy Science.* **3**: 7-18.
- Singh, R., Rastogi, S., Dwivedi, N.U. (2010): Phenylpropanoid Metabolism in Ripening Fruits. *Comperhensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Volume 9, Issue 4, 398-416
- Shivaprasad, H.N., Mohan, S., Kharya, M.D., Shiradkar, M.R., Lakshman, K.: (2005): In-Vitro Models For Antioxidant Activity Evaluation: A Review. *Pharmaceutical Reviews*, 3(4).
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., Dimitrović, R. (2007): Lipidna peroksidacija-uzroci i posledice. *Medicina,*(**43**): 84-93.
- This, P., Lacombe, T., Thomas, M.R. (2006): Historical origins and genetic diversity of wine grapes.*Trends in Genetics*, 22 , pp. 511–519
- Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapta, P., Bilton, R.F. (2001): Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527, pp. 161–166
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.*, 160, pp. 1–40

- Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, GarciaParilla MC (2007): Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235.
- Vincent, D., Ergül, A., Bohlman, C.M., Tattersall, A.R.E., Tillett, R.L., Wheatley, D.M., Woolsey, R., Quilici, R.D., Joets, J., Schlauch, K., Schooley, A.D., Cushman, C.J., Cramer, R.G. (2007): Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *Journal of Experimental Botany.* 58: 1873-1892.
- Wang L.-S., Stoner G.D. (2008): Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters.* 269: 281-290.
- Waterman P. G., Mole S. (1994), *Analysis of Phenolic Plant Metabolites,* Blackwell Scientific Publications, London
- Winkel-Shirley, B. (2001): Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology.* 126: 485-493.
- www.vinotekabeograd.com - 6.10.2016
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., Li, H.-B., (2010): Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 622–646
- Young IS, Woodside JV. (2001): Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology.* ; 54:176–86
- Yu L. L. (2001): Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*. 49: 3452-3456.
- Zohary, D., Hopf, M. (2001): *Domestication of Plants in the Old World—The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley (3rd ed.)*. Oxford University Press, Oxford.
- Žunić, D. (2000): *Vinograd na malom posedu.* Neven, Beograd. 19-24.

7.- Prilog

Tabela 7.1. Kalibraciona kriva galne kiseline

pocetna koncentracija µg/ml	**radna koncentracija µg/ml**	**A1**	**A2**	**A3**	**A_{kor}**	**Asr**	**A' (Asr-Akor)**	**Akonacno (A-Asp)**
80	8.000	0.745	0.719	0.719	0.054	0.719	0.665	0.651
60	6.000	0.560	0.535	0.524	0.053	0.529	0.477	0.463
50	5.000	0.464	0.466	0.452	0.052	0.461	0.409	0.395
40	4.000	0.390	0.380	0.378	0.056	0.383	0.327	0.313
30	3.000	0.303	0.300	0.295	0.050	0.299	0.249	0.236
20	2.000	0.242	0.241	0.243	0.055	0.242	0.187	0.173
10	1.000	0.127	0.131	0.126	0.050	0.128	0.078	0.065
5	0.500	0.100	0.096	0.099	0.052	0.099	0.046	0.033
2.5	0.250	0.080	0.081	0.083	0.054	0.081	0.027	0.013
1.25	0.125	0.071	0.072	0.073	0.056	0.072	0.016	0.002
0.625	0.063	0.069	0.072	0.070	0.052	0.070	0.018	0.004
slepa proba		0.066	0.064	0.066	0.052	0.065	0.014	



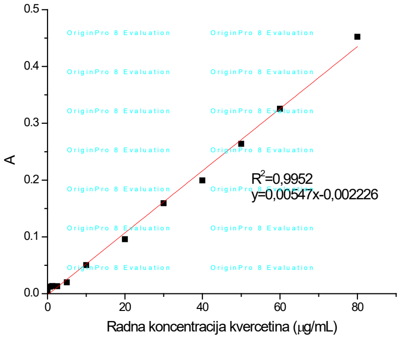
Grafik 7.1. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije galne kiseline

Tabela 7.2. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima

Određivanje sadržaja ukupnih fenola	Apsorbancije radne probe i korekcije					Očitana konc. galne kiseline (µg/mL)	µg ekv. galne kiseline	mg suvog ekstr.	mg ekv. galne kiseline/g suvog ekstrakta	
	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A					
Italijanski rizling Bajilo	0.585	0.567	0.583	0.050	0.512	6.421	1.926	0.019	102.7	**109.1±5.583**
	0.345	0.338	0.341	0.051	0.274	3.473	1.042	0.009	111.1	
	0.206	0.205	0.198	0.050	0.137	1.770	0.531	0.005	113.3	
	0.064	0.063	0.063	0.047						
Cabernet Sauvignon	0.531	0.530	0.536	0.056	0.472	5.929	1.779	0.019	94.87	**99.43±4.541**
	0.304	0.306	0.307	0.057	0.245	3.108	0.933	0.009	99.47	
	0.181	0.179	0.188	0.054	0.125	1.624	0.487	0.005	104.0	
	0.060	0.063	0.062	0.058						
Sila	0.682	0.695	0.663	0.060	0.604	7.555	2.266	0.019	120.9	**125.3±4.462**
	0.388	0.386	0.390	0.051	0.321	4.056	1.217	0.009	129.8	
	0.224	0.219	0.221	0.053	0.152	1.959	0.588	0.005	125.4	
	0.064	0.063	0.063	0.047						
Muscat Hamburg	0.675	0.648	0.682	0.052	7.514	2.254	0.019	120.2	7.514	**127.3±6.574**
	0.388	0.385	0.383	0.052	4.013	1.204	0.009	128.4	4.013	
	0.227	0.228	0.227	0.050	2.082	0.624	0.005	133.2	2.082	
	0.064	0.063	0.063	0.047						
Merlot	0.820	0.795	0.798	0.055	9.315	2.795	0.019	149.0	9.315	**162.0 ±12.30**
	0.467	0.456	0.464	0.055	5.106	1.532	0.009	163.4	5.106	
	0.271	0.266	0.273	0.053	2.711	0.813	0.005	173.5	2.711	
	0.060	0.063	0.062	0.058						
Chardonnay	0.808	0.816	0.798	0.068	9.242	2.773	0.019	147.9	9.242	**162.0±13.69**
	0.469	0.464	0.458	0.055	5.092	1.528	0.009	163.0	5.092	
	0.275	0.332	0.270	0.054	2.737	0.821	0.005	175.2	2.737	
	0.060	0.063	0.062	0.058						
Frankovka	0.574	0.567	0.584	0.054	6.375	1.912	0.019	102.0	6.375	**106.8 ±4.214**
	0.337	0.322	0.333	0.051	3.389	1.017	0.009	108.4	3.389	
	0.204	0.192	0.198	0.053	1.718	0.515	0.005	109.9	1.718	
	0.057	0.061	0.060	0.047						
Italijanski rizling Agner	0.686	0.700	0.689	0.050	7.861	2.358	0.019	125.8	7.861	**137.4±10.91**
	0.409	0.407	0.401	0.049	4.338	1.302	0.009	138.8	4.338	
	0.240	0.244	0.237	0.048	2.304	0.691	0.005	147.4	2.304	
	0.057	0.061	0.060	0.047						
Župljanka	0.798	0.766	0.789	0.053	0.719	8.982	2.695	0.019	143.7	**151.9±7.111**
	0.451	0.436	0.452	0.048	0.386	4.856	1.457	0.009	155.4	
	0.259	0.259	0.259	0.055	0.191	2.446	0.734	0.005	156.6	
	0.057	0.061	0.060	0.047						

Tabela 7.3. Kalibraciona kriva kvercetina

Početna konc. (µg/mL)	**Radna konc. (µg/mL)**	**A_1**	**A_2**	**A_3**	**A_{kor}**	**A_{sr}**	**$A'(A_{sr}-A_{kor})$**	**$A(A'-A_{sp})$**
80	7.947	0.707	0.714	0.707	0.254	0.710	0.456	0.452
60	5.960	0.528	0.530	0.533	0.199	0.529	0.330	0.326
50	4.967	0.429	0.440	0.433	0.171	0.435	0.264	0.264
40	3.974	0.358	0.348	0.359	0.150	0.353	0.204	0.199
30	2.980	0.284	0.284	0.284	0.120	0.284	0.164	0.159
20	1.987	0.207	0.205	0.200	0.106	0.206	0.100	0.096
10	0.993	0.125	0.128	0.130	0.073	0.128	0.054	0.050
5	0.497	0.092	0.091	0.093	0.068	0.092	0.024	0.020
2.5	0.248	0.070	0.069	0.062	0.052	0.070	0.017	0.013
1.25	0.124	0.070	0.067	0.078	0.051	0.069	0.018	0.013
0.625	0.062	0.080	0.060	0.070	0.053	0.070	0.017	0.012
0	0.000	0.054	0.056	0.055	0.051	0.055	0.004	-0.487



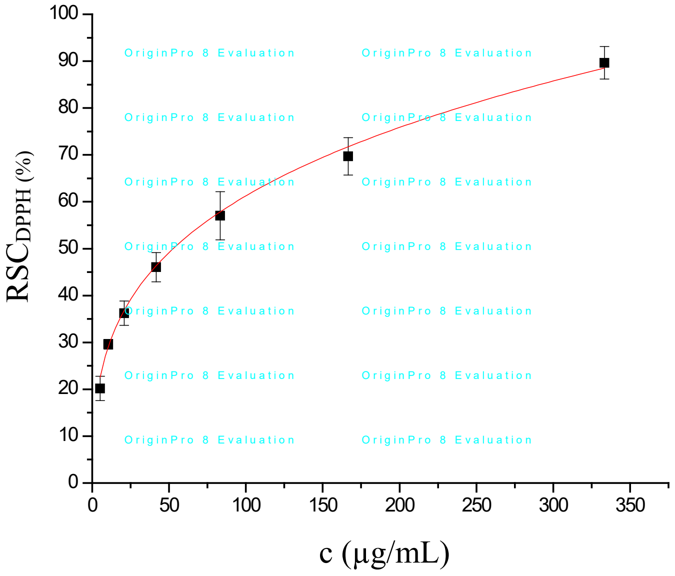
Grafik 7.2. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije kvercetina

Tabela 7.4. Ukupan sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	Apsorbancije radne probe i korekcije					Očitana konc. kverc. (µg/mL)	µg ekv. kverc.	mg suvog ekstr.	mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta	
	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A					
Italijanski rizling Bajilo	0.382	0.387	0.382	0.101	0.276	50.84	15.35	0.075	204.7	203.3± 4.121
	0.229	0.220	0.222	0.084	0.133	24.67	7.451	0.038	198.7	
	0.099	0.100	0.110	0.063	0.033	6.412	1.936	0.009	206.6	
	0.061	0.065	0.063	0.056						
Cabernet Sauvignon	0.635	0.641	0.636	0.139	0.491	90.14	27.22	0.150	181.5	173.0± 7.938
	0.343	0.338	0.337	0.100	0.231	42.66	12.88	0.075	171.8	
	0.195	0.205	0.195	0.080	0.110	20.58	6.216	0.038	165.8	
	0.058	0.059	0.065	0.053						
Sila	0.310	0.303	0.317	0.110	0.186	34.48	10.41	0.075	138.8	133.9± 5.442
	0.187	0.189	0.180	0.083	0.089	16.72	5.050	0.038	134.7	
	0.092	0.101	0.093	0.062	0.020	3.975	1.200	0.009	128.1	
	0.065	0.075	0.068	0.053						
Muscat Hamburg	0.531	0.543	0.518	0.126	0.384	70.64	21.33	0.075	284.4	238.2± 17.99
	0.295	0.293	0.289	0.110	0.168	31.14	9.405	0.038	250.8	
	0.114	0.117	0.113	0.064	0.036	6.996	2.113	0.009	225.4	
	0.070	0.073	0.062	0.054						
Merlot	0.652	0.648	0.645	0.165	0.478	87.76	26.50	0.075	353.4	329.8± 22.66
	0.346	0.350	0.345	0.121	0.220	40.71	12.29	0.038	327.8	
	0.130	0.128	0.127	0.073	0.050	9.567	2.889	0.009	308.2	
	0.075	0.061	0.059	0.059						
Chardonnay	0.486	0.489	0.485	0.154	0.329	60.51	18.15	0.075	242.1	227.7± 20.28
	0.259	0.259	0.261	0.111	0.144	26.67	8.002	0.038	213.4	
	0.104	0.104	0.103	0.071	0.029	5.621	1.686	0.009	179.9	
	0.057	0.060	0.061	0.055						
Frankovka	0.547	0.554	0.554	0.136	0.416	76.39	22.92	0.150	152.8	146.6± 5.577
	0.299	0.300	0.303	0.103	0.196	36.32	10.90	0.075	145.3	
	0.177	0.179	0.179	0.083	0.095	17.73	5.320	0.038	141.9	
	0.069	0.067	0.070	0.068						
Italijanski rizling Agner	0.401	0.390	0.398	0.145	0.241	44.41	13.32	0.075	177.7	141.8± 5.259
	0.219	0.225	0.226	0.120	0.092	17.26	5.178	0.038	138.1	
	0.108	0.107	0.113	0.076	0.023	4.548	1.364	0.009	145.5	
	0.067	0.067	0.068	0.057						
Župljanka	0.429	0.418	0.423	0.135	0.276	50.87	15.26	0.075	203.5	184.1± 17.66
	0.242	0.238	0.244	0.111	0.121	22.48	6.744	0.038	179.8	
	0.108	0.113	0.113	0.075	0.027	5.280	1.584	0.009	169.0	
	0.063	0.065	0.070	0.056						

Tabela 7.5. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Italijanski rizling Bajilo*)

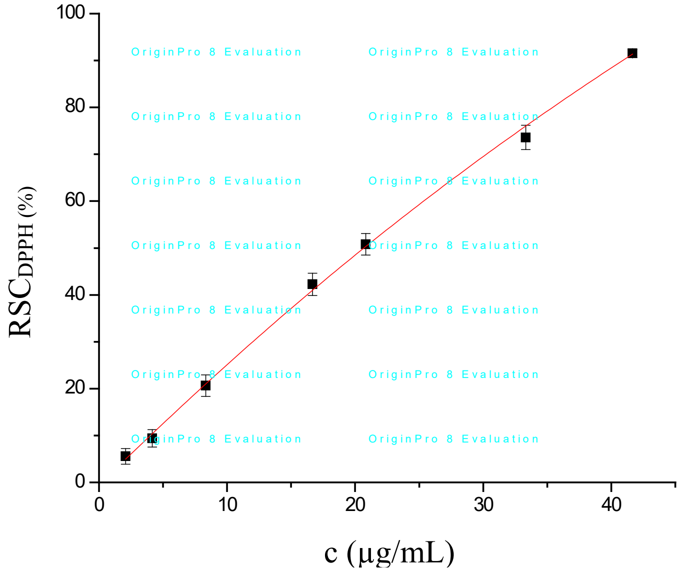
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							RSC$_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Italijanski rizling Bajilo												
10.000	333.3	0.106	0.095	0.094	0.080	0.099	0.019	0.181	85.65	91.40	91.87	89.64
5.000	166.7	0.116	0.113	0.102	0.055	0.110	0.055	0.181	66.58	68.35	74.17	69.70
2.500	83.33	0.137	0.134	0.119	0.052	0.130	0.078	0.181	53.27	54.95	62.87	57.03
1.250	41.67	0.153	0.148	0.142	0.050	0.147	0.098	0.181	43.03	45.86	49.22	46.04
0.625	20.83	0.170	0.161	0.163	0.049	0.165	0.116	0.181	33.31	38.30	37.07	36.23
0.313	10.42	0.181	0.177	0.179	0.051	0.179	0.128	0.181	28.66	30.72	29.48	29.62
0.156	5.208	0.201	0.196	0.191	0.051	0.196	0.145	0.181	17.57	20.15	22.82	20.18
Kontrola		0.232	0.235	0.228	0.050	0.232	0.181	0.181				
IC_{50} (µg/mL)									67.87	57.81	44.76	62.84± 7.111



Grafik 7.3. Zavisnost RSC$_{DPPH}$– radna koncentracija ekstrakta lišća *Italijanskog rizlinga Bajilo*

Tabela 7.6. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Cabernet Sauvignon*)

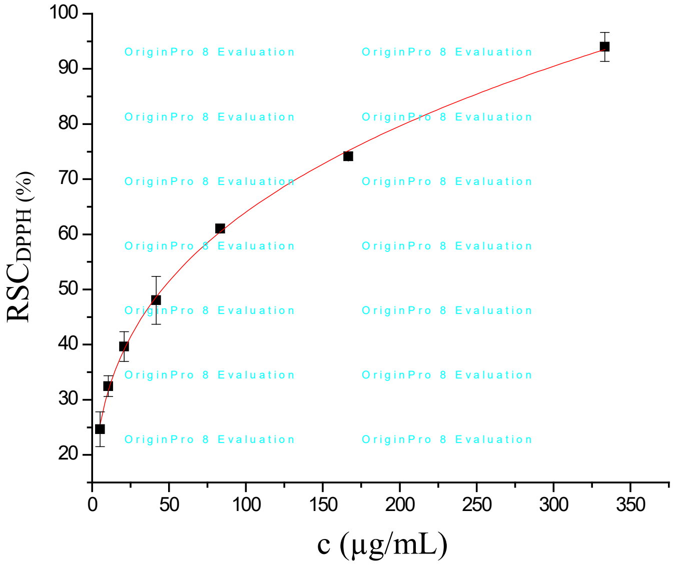
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							RSC$_{DPPH^{\bullet}}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}- A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Cabernet Sauvignon												
1.250	41.667	0.059	0.062	0.061	0.046	0.061	0.015	0.178	92.32	90.60	91.62	91.51
1.000	33.333	0.096	0.095	0.088	0.046	0.093	0.047	0.178	71.75	72.45	76.54	73.58
0.625	20.833	0.132	0.138	0.130	0.046	0.133	0.088	0.178	51.30	48.29	52.82	50.80
0.500	16.667	0.151	0.152	0.144	0.046	0.149	0.103	0.178	41.14	40.66	44.98	42.26
0.250	8.333	0.187	0.190	0.182	0.045	0.186	0.141	0.178	20.12	18.69	23.14	20.65
0.125	4.167	0.203	0.210	0.207	0.045	0.207	0.161	0.178	11.27	7.52	9.38	9.390
0.063	2.083	0.213	0.219	0.214	0.047	0.215	0.168	0.178	6.78	3.65	6.23	5.560
Kontrola		0.222	0.233	0.226	0.049	0.227	0.178					
IC_{50} (µg/mL)									21.20	21.62	19.36	20.73± 1.203



Grafik 7.4. Zavisnost RSC$_{DPPH^{\cdot}}$– radna koncentracija ekstrakta lišća *Cabernet souvignon Bajilo*

Tabela 7.7. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Sila*)

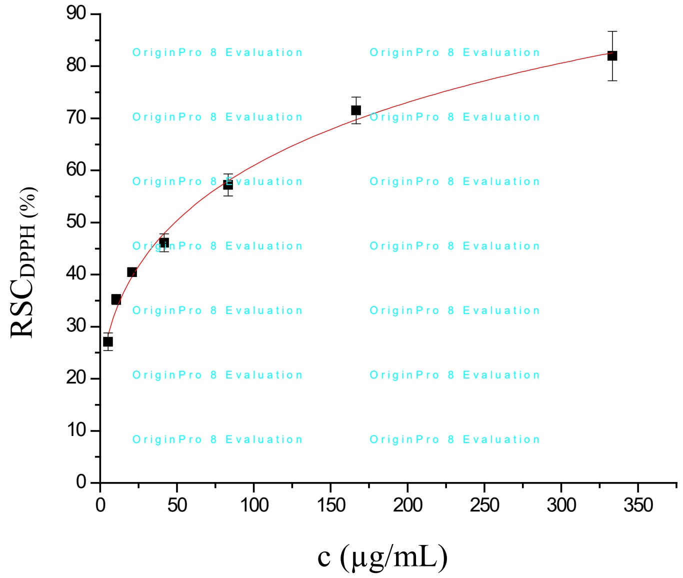
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							$RSC_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Sila												
10.000	333.333	0.093	0.090	0.100	0.083	0.094	0.011	0.189	94.65	96.23	91.12	94.00
5.000	166.667	0.104	0.104	0.106	0.056	0.105	0.049	0.189	74.41	74.65	73.31	74.13
2.500	83.333	0.128	0.125	0.125	0.053	0.126	0.074	0.189	60.16	61.50	61.55	61.07
1.250	41.667	0.156	0.140	0.152	0.051	0.149	0.098	0.189	44.74	52.97	46.44	48.05
0.625	20.833	0.160	0.167	0.157	0.047	0.161	0.114	0.189	40.51	36.65	41.84	39.67
0.313	10.417	0.177	0.173	0.179	0.049	0.176	0.128	0.189	32.09	34.50	30.81	32.47
0.156	5.208	0.198	0.187	0.196	0.051	0.193	0.142	0.189	22.26	28.24	23.46	24.65
Kontrola		0.249	0.227	0.237	0.048	0.238	0.189					
IC_{50} (µg/mL)									48.60	43.01	44.78	45.46± 2.860



Grafik 7.5. Zavisnost $RSC_{DPPH^\cdot}$– radna koncentracija ekstrakta lišća *Sila*

Tabela 7.8. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Muscat Hamburg*)

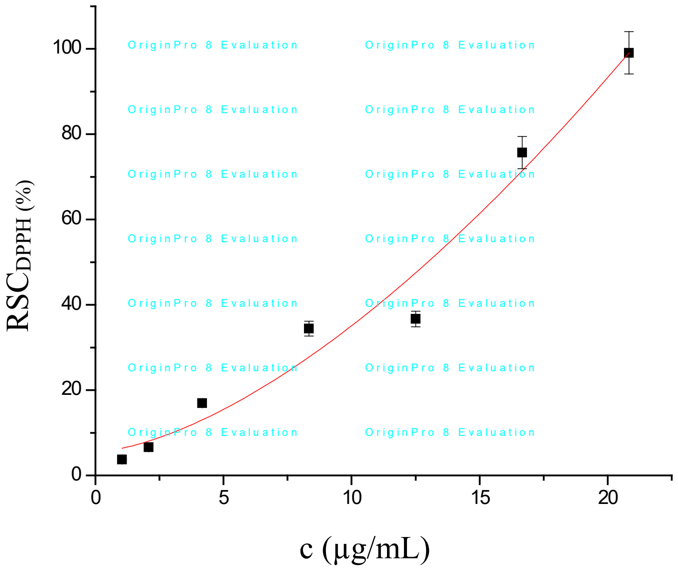
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							RSC$_{DPPH^•}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Muscat Hamburg												
10.000	333.333	0.084	0.096	0.102	0.060	0.094	0.035	0.193	87.15	80.97	77.79	81.97
5.000	166.667	0.118	0.114	0.112	0.060	0.115	0.055	0.193	69.73	71.97	73.35	71.54
2.500	83.333	0.131	0.135	0.127	0.049	0.131	0.082	0.193	57.11	55.16	59.37	57.21
1.250	41.667	0.150	0.155	0.156	0.050	0.154	0.104	0.193	48.06	45.39	44.88	46.11
0.625	20.833	0.165	0.163	0.163	0.049	0.164	0.115	0.193	39.83	40.47	40.41	40.44
0.313	10.417	0.180	0.177	0.177	0.053	0.178	0.125	0.193	34.14	35.61	35.96	35.24
0.156	5.208	0.191	0.197	0.193	0.053	0.195	0.142	0.193	28.74	25.32	27.27	27.11
Kontrola		0.230	0.241	0.243	0.049	0.242	0.193					
IC_{50} (µg/mL)									50.61	53.97	47.47	50.69± 3.251



Grafik 7.6. Zavisnost RSC$_{DPPH^•}$– radna koncentracija ekstrakta lišća *Muscat Hamburg*

Tabela 7.9. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Merlot*)

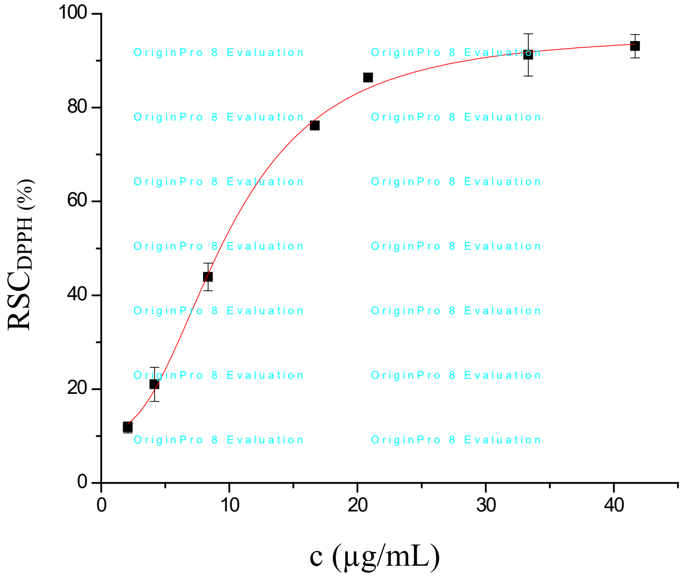
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (μg/mL)	Apsorbancija							RSC$_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}- A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Merlot												
0.625	20.833	0.063	0.062	0.060	0.060	0.062	0.002	0.184	98.62	98.72	99.90	99.08
0.500	16.667	0.098	0.100	0.091	0.051	0.096	0.045	0.184	74.96	73.79	78.37	75.70
0.375	12.500	0.208	0.149	0.142	0.050	0.166	0.116	0.184	13.93	46.13	50.02	36.69
0.250	8.333	0.171	0.169	0.164	0.047	0.168	0.121	0.184	32.73	33.97	36.59	34.43
0.125	4.167	0.200	0.203	0.195	0.047	0.199	0.153	0.184	16.62	15.15	19.04	16.94
0.063	2.083	0.218	0.221	0.214	0.046	0.217	0.172	0.184	6.52	4.73	8.51	6.59
0.031	1.042	0.224	0.231	0.224	0.049	0.227	0.177	0.184	5.08	1.15	4.94	3.72
Kontrola		0.237	0.240	0.245	0.057	0.241	0.184					
IC_{50} (μg/mL)									11.85	12.30	11.57	11.91± 0.369



Grafik 7.7. Zavisnost RSC$_{DPPH}$– radna koncentracija ekstrakta lišća *Merlot*

Tabela 7.10. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Chardonnay*)

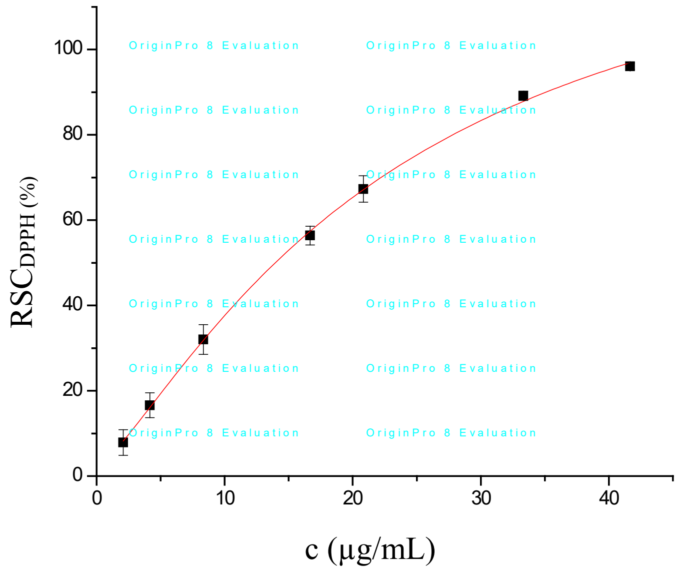
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							RSC$_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Chardonnay												
0.625	20.833	0.066	0.058	0.058	0.049	0.061	0.012	0.179	90.24	94.54	94.56	93.11
0.500	16.667	0.075	0.059	0.063	0.050	0.066	0.016	0.179	86.20	94.90	92.61	91.24
0.375	12.500	0.074	0.072	0.074	0.049	0.073	0.024	0.179	86.06	87.25	85.83	86.38
0.250	8.333	0.089	0.090	0.087	0.046	0.089	0.043	0.179	75.91	75.46	77.23	76.20
0.125	4.167	0.139	0.146	0.149	0.044	0.144	0.100	0.179	47.19	43.11	41.45	43.92
0.063	2.083	0.180	0.191	0.191	0.046	0.187	0.142	0.179	25.19	19.02	18.79	21.00
0.031	1.042	0.203	0.206	0.206	0.047	0.205	0.158	0.179	13.20	11.20	11.12	11.84
Kontrola		0.220	0.242	0.224	0.049	0.229	0.179					
IC_{50} (µg/mL)									8.590	9.545	9.677	9.271± 0.593



Grafik 7.8. Zavisnost RSC$_{DPPH^\cdot}$ – radna koncentracija ekstrakta lišća *Chardonnay*

Tabela 7.11. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Frankovka*)

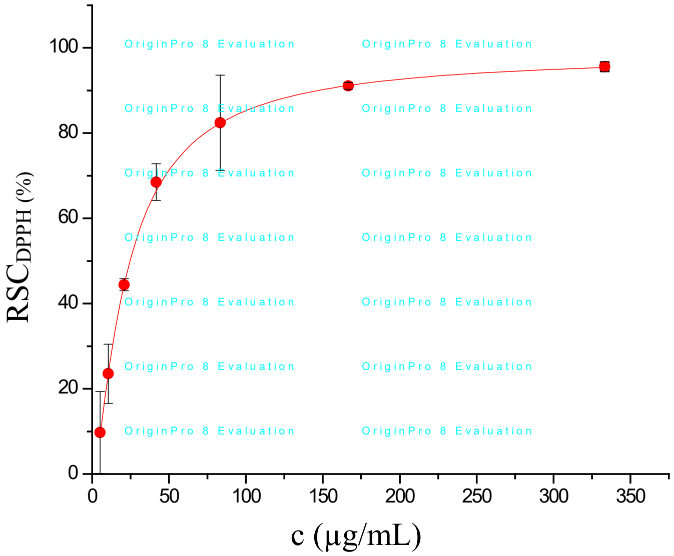
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							$RSC_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}- A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Frankovka												
1.250	41.667	0.060	0.061	0.063	0.054	0.061	0.007	0.179	96.74	96.23	95.27	96.08
1.000	33.333	0.066	0.064	0.068	0.047	0.066	0.019	0.179	89.01	90.34	88.20	89.18
0.625	20.833	0.104	0.111	0.101	0.047	0.105	0.059	0.179	68.03	63.94	69.97	67.31
0.500	16.667	0.124	0.127	0.119	0.045	0.123	0.078	0.179	56.20	54.32	58.69	56.41
0.250	8.333	0.167	0.178	0.167	0.049	0.171	0.122	0.179	34.22	28.03	33.87	32.04
0.125	4.167	0.191	0.200	0.201	0.048	0.198	0.149	0.179	19.95	14.99	14.83	16.59
0.063	2.083	0.205	0.214	0.215	0.046	0.211	0.165	0.179	11.30	6.35	5.88	7.85
Kontrola		0.220	0.242	0.224	0.049	0.229	0.179					
IC_{50} (µg/mL)									13.64	15.07	13.13	13.95± 1.007



Grafik 7.9. Zavisnost $RSC_{DPPH^\cdot}$ – radna koncentracija ekstrakta lišća *Frankovka*

Tabela 7.12. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt *lišća Italijanski rizling Agner*)

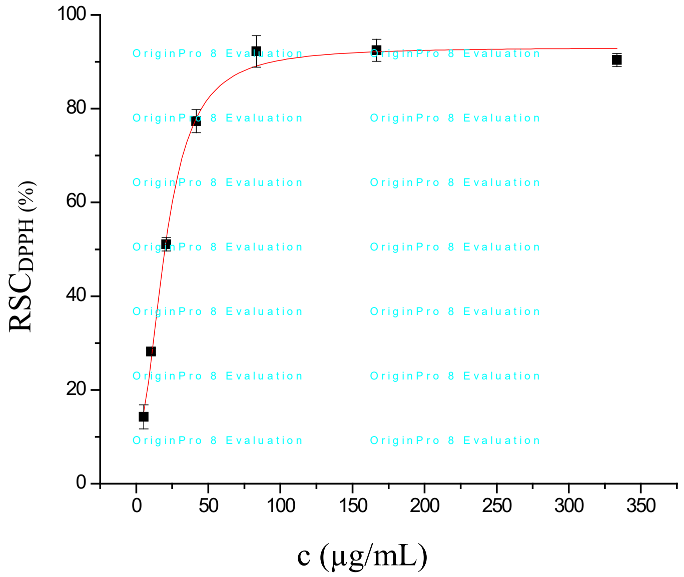
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							$RSC_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Italijanski rizling Agner												
10.00	333.3	0.073	0.070	0.074	0.065	0.072	0.007	0.167	95.03	96.94	94.74	95.57
5.000	166.6	0.071	0.068	0.069	0.054	0.069	0.015	0.167	90.20	91.62	91.42	91.08
2.500	83.33	0.068	0.099	0.066	0.048	0.078	0.029	0.167	88.07	69.52	89.64	82.41
1.250	41.66	0.107	0.093	0.097	0.046	0.099	0.053	0.167	63.59	71.86	69.97	68.47
0.625	20.83	0.148	0.148	0.144	0.054	0.147	0.093	0.167	43.83	43.38	46.03	44.41
0.313	10.41	0.190	0.172	0.169	0.049	0.177	0.128	0.167	15.58	26.72	28.29	23.53
0.156	5.208	0.218	0.192	0.188	0.048	0.199	0.151	0.167	-1.31	14.02	16.45	9.72
Kontrola		0.226	0.210	0.202	0.045	0.212	0.167					
IC_{50} (µg/mL)									25.53	25.85	22.87	24.75± 1.636



Grafik 7.10. Zavisnost $RSC_{DPPH^\cdot}$ – radna koncentracija ekstrakta lišća *Italijanski rizling Agner*

Tabela 7.13. Neutralizacija DPPH radikala (ekstrakt lišća *Župljanka Agner*)

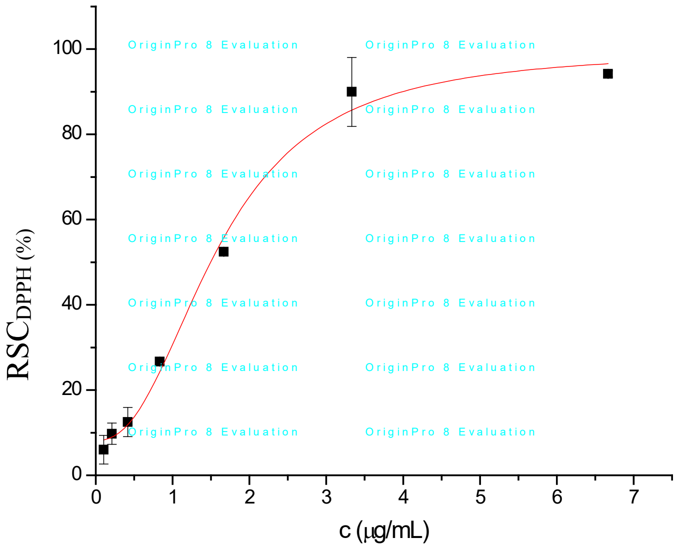
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							$RSC_{DPPH^\cdot}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Župljanka Agner												
10.000	333.333	0.074	0.078	0.079	0.061	0.077	0.016	0.162	91.95	89.91	89.23	90.36
5.000	166.667	0.069	0.064	0.072	0.056	0.068	0.012	0.162	92.16	94.92	90.25	92.44
2.500	83.333	0.061	0.063	0.072	0.053	0.065	0.013	0.162	94.64	93.66	88.38	92.23
1.250	41.667	0.089	0.094	0.086	0.053	0.090	0.037	0.162	77.82	74.66	79.51	77.33
0.625	20.833	0.126	0.130	0.126	0.048	0.128	0.079	0.162	51.87	49.42	51.94	51.08
0.313	10.417	0.165	0.166	0.164	0.048	0.165	0.116	0.162	28.40	27.48	28.71	28.20
0.156	5.208	0.184	0.189	0.192	0.049	0.188	0.139	0.162	17.00	13.86	11.89	14.25
Kontrola		0.213	0.209	0.204	0.046	0.208	0.162					
IC_{50} (µg/mL)									19.83	20.82	18.93	19.86± 0.946



Grafik 7.11. Zavisnost $RSC_{DPPH^\cdot}$ – radna koncentracija ekstrakta lišća *Župljanka Agner*

Tabela 7.14. Neutralizacija DPPH radikala (*Trolox standard*)

Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							$RSC_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
Trolox												
0.200	6.667	0.062	0.059	0.063	0.045	0.061	0.016	0.286	93.81	95.04	93.72	94.19
0.1	3.333	0.063	0.104	0.064	0.048	0.077	0.028	0.286	94.84	80.66	94.42	89.97
0.05	1.667	0.186	0.184	0.183	0.048	0.184	0.136	0.286	51.89	52.70	52.72	52.44
0.025	0.833	0.256	0.255	0.259	0.047	0.256	0.209	0.286	26.95	27.15	25.87	26.66
0.012	0.417	0.286	0.294	0.306	0.045	0.295	0.250	0.286	15.59	13.02	8.805	12.47
0.006	0.208	0.299	0.311	0.312	0.049	0.307	0.258	0.286	12.61	8.576	8.089	9.757
0.003	0.104	0.307	0.325	0.322	0.048	0.317	0.269	0.286	9.819	3.561	4.585	5.988
Kontrola		0.341	0.332	0.334	0.049	0.335	0.286					
IC_{50} (µg/mL)								1.522	1.543	1.479	1.515	1.522± 0.032

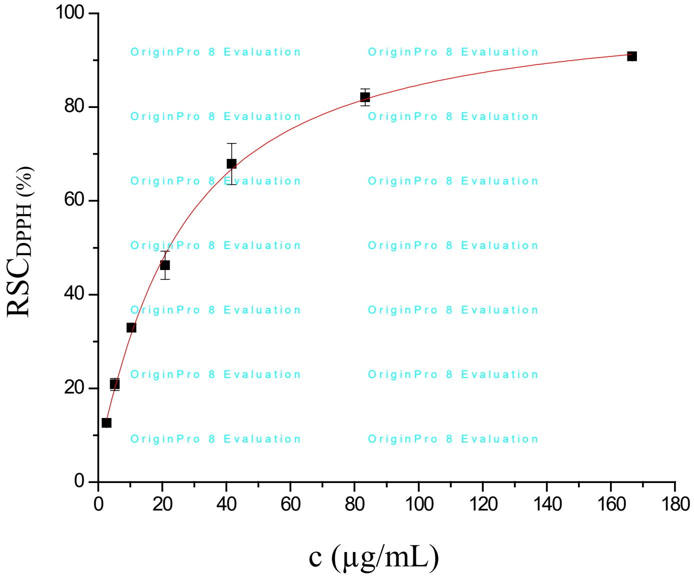


c (µg/mL)

Grafik 7.12. Zavisnost $RSC_{DPPH^\cdot}$ – radna koncentracija standarda *Trolox*

Tabela 7.15. Neutralizacija DPPH radikala (*BHT*)

Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							$RSC_{DPPH^\bullet}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
BHT												
5.0000	166.7	0.077	0.075	0.075	0.049	0.075	0.026	0.284	90.73	90.73	91.00	90.82
2.5	83.33	0.102	0.094	0.103	0.049	0.099	0.051	0.284	81.24	84.15	80.84	82.07
1.25	41.67	0.136	0.128	0.153	0.048	0.139	0.091	0.284	68.89	71.68	63.07	67.88
0.625	20.83	0.209	0.192	0.202	0.048	0.201	0.152	0.284	43.33	49.33	46.10	46.25
0.3125	10.42	0.235	0.235	0.238	0.045	0.235	0.190	0.284	33.34	33.36	32.14	32.95
0.15625	5.208	0.268	0.276	0.273	0.047	0.272	0.225	0.284	22.18	19.60	20.74	20.84
0.078125	2.604	0.294	0.296	0.299	0.048	0.296	0.248	0.284	13.27	12.79	11.73	12.59
Kontrola		0.327	0.332	0.334	0.046	0.331	0.284	0.327				
IC_{50} (µg/mL)									22.77	20.05	23.75	23.26± 0.692

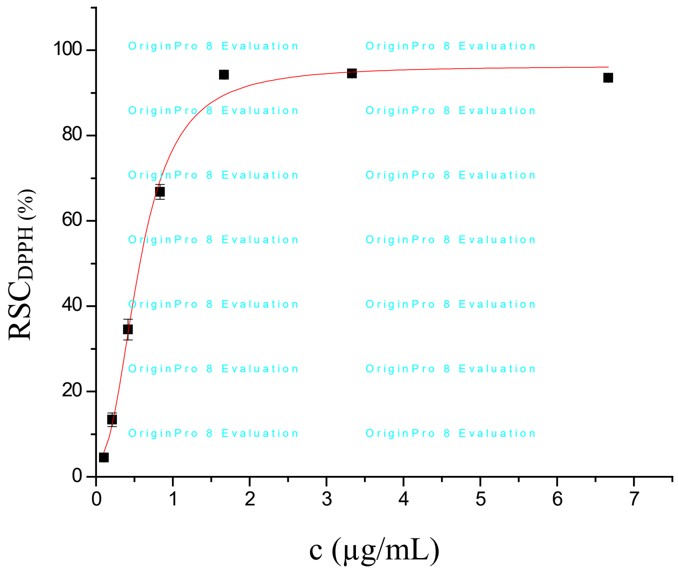


OriginPro 8 Evaluation

Grafik 7.13. Zavisnost RSC_{DPPH} – radna koncentracija standarda *BHT*

Tabela 7.16. Neutralizacija DPPH radikala (*PG*)

Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija							$RSC_{DPPH^{\bullet}}$(%)			
		A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	A_{sr}-A_{kor}	A_{kon}	RSC_1	RSC_2	RSC_3	Srednja vrednost
PG												
5.0000	166.7	0.077	0.075	0.075	0.049	0.075	0.026	0.284	93.44	93.46	93.69	93.53
2.5	83.33	0.102	0.094	0.103	0.049	0.099	0.051	0.284	94.50	94.68	94.54	94.58
1.25	41.67	0.136	0.128	0.153	0.048	0.139	0.091	0.284	94.37	94.38	93.98	94.24
0.625	20.83	0.209	0.192	0.202	0.048	0.201	0.152	0.284	68.16	64.87	67.44	66.82
0.3125	10.42	0.235	0.235	0.238	0.045	0.235	0.190	0.284	37.20	32.49	33.86	34.52
0.15625	5.208	0.268	0.276	0.273	0.047	0.272	0.225	0.284	11.66	13.68	14.78	13.37
0.078125	2.604	0.294	0.296	0.299	0.048	0.296	0.248	0.284	4.769	4.659	4.102	4.510
Kontrola		0.327	0.332	0.334	0.046	0.331	0.284	0.327				
IC_{50} (µg/mL)									0.546	0.594	0.568	0.570± 0.024



Grafik 7.14. Zavisnost RSC_{DPPH} – radna koncentracija standarda *PG*

Tabela 7.17. IC_{50} vrednost, sadržaj fenola i sadržaj flavonoida u ispitivanim uzorcima

Sorte vinove loze i standardi	IC_{50}	Sadžaj fenola (mg ekv. galne kiseline/g suvog ekstrakta)	Sadržaj flavonoida (mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta)
Italijanski rizling Bajilo	62.84± 7.111	109.1± 5.58	203.3± 4.12
Cabernet Sauvignon	20.73± 1.203	99.43± 4.54	173.0± 7.94
Sila	45.46± 2.860	125.3± 4.46	133.9± 5.44
Muscat Hamburg	50.69± 3.251	127.3± 6.57	238.2± 17.99
Merlot	11.91± 0.369	162.0 ± 12.30	329.8± 22.66
Chardonnay	9.271± 0.593	162.0± 13.69	227.7± 20.28
Frankovka	13.95± 1.007	106.8 ± 4.21	146.6± 5.58
Italijanski rizling Agner	24.75± 1.636	137.4± 10.91	141.8± 5.26
Župljanka Agner	19.86± 0.946	151.9± 7.11	184.1± 17.66
Trolox	1.522± 0.032		
BHT	23.26± 0.692		
PG	0.570± 0.024		

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR
Identifikacioni broj:
IBR
Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD
Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ
Vrsta rada: Diplomski rad
VR
Autor: Luka Banjac
AU
Mentor: dr Ivana Beara, vandredni profesor PMF-a u Novom Sadu
MN
Naslov rada: Potencijal neutralizacije DPPH radikala kao merilo

antioksidantneaktivnosti ekstrakata lišća različitih sorti

vinove loze (*Vitis vinifera* L.)
Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP
Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI
Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP
Uže geog. područje: Vojvodina
UGP
Godina: 2016
GO
Izdavač: Autorski reprint
IZ
Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
MA
Fizički opis rada: Broj poglavlja: 7. Strana: . Lit. citata: 95. Tabela: 27.
FO Grafika: 14. Slika: 4. Histograma: 3.
Naučna oblast: Biohemija
NO
Naučna disciplina: Biohemija lekovitog bilja
ND
Predmetna odrednica/ Ključne reči: *Vitis vinifera* L., lišće vinove loze, antioksidantna aktivnost

PO

UDK	
Čuva se:	Biblioteka Departmana za hemiju, PMF, Trg D. Obradovića 3, Novi Sad
ČU	
Važna napomena:	-
VN	
Izvod:	U ovom radu je ispitan antioksidantni potencijal ekstrakata lišća različitih sorti vinove loze (*Vitis vinifera* L.) i određivanje zavisnosti ove aktivnosti od sadržaja ukupnih fenola i flavonoida. Antioksidantna aktivnost ekstrakata je ispitana primenom spektrofotometrijskog testa zasnovanog na sposobnosti neutralizacije slobodnog DPPH radikala. Ispitani ekstrakti su pokazali odličnu antioksidantnu aktivnost.
IZ	
Datum prihvatanja teme od strane NN veća:	02.06.2015.
DP	
Datum odbrane:	2016.
DO	
Članovi komisije: (Naučni stepen/ime i prezime/ zvanje/fakultet)	
KO	
Predsednik:	dr Nataša Simin, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Mentor:	dr Ivana Beara, vandredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Član:	dr Marija Lesjak, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:	
ANO	
Identification number:	
INO	
Document type:	Monography document
DT	
Type of record:	Textual printed material
TR	
Content code:	Graduate work
CC	
Author:	Luka Banjac
AU	
Mentor:	dr Ivana Beara, associate professor, Faculty of Science,
MN	Novi Sad
Title:	Potential of DPPH radical neutralization as a measure of antioxidant activity of various vine (*Vitis vinifera* L.) leaf extracts
TI	
Language of text:	Serbian (Latin)
LT	
Language of abstract:	Serbian/English
LA	
Country of publication:	Serbia
CP	
Locality of publication:	Vojvodina
LP	
Publication year:	2016.
PY	
Publisher:	Author's reprint

PU

Publishing place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description: Chapters: 7. Pages: . References: 95. . Tables: 28. Figures: 14. Pictures: 4. Charts: 3.

PD

Scientific field: Biochemistry

SF

Scientific discipline: Biochemistry of medicinal plants

SD

Subject/Key words: *Vitis vinifera* L., leaves of grapevine, antioxidant activity

SKW

UC

Holding data: Deparment of Chemistry (Library), Faculty of Sciences, Trg D. Obradovića 3, Novi Sad

HD

Note: -

N

Abstract: In this study, the antioxidant potential of extracts of leaves of different varieties of grapevine (*Vitis vinifera* L.) and determine the dependence of the activity of the contents of total phenols and flavonoids. The antioxidant activity of the extracts was tested using spectrophotometric assay based on the ability of neutralizing the free radicals (capacity neutralization DPPH radical). The tested extracts showed an excellent antioxidant activity.

AB

Accepted by

the Scientific Board on: 02.06.2015.

ASB

Defended: .2016.

DE

Thesis defend board:

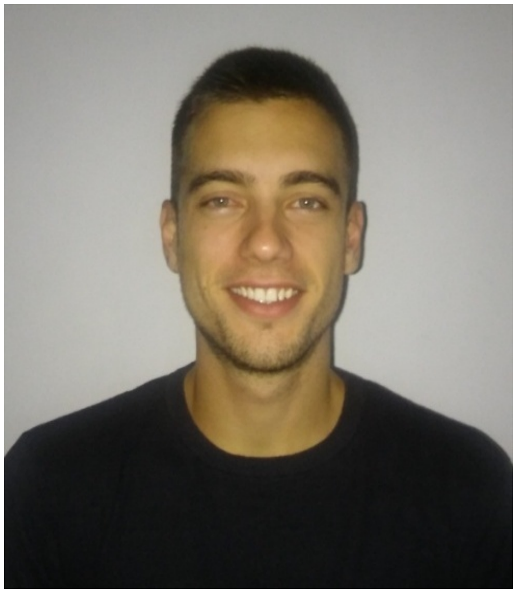
Degree/name/surname/title/

faculty)

DB

President:	Nataša Simin PhD, assistant professor, Faculty of Science, University of Novi Sad
Mentor:	Ivana Beara PhD, associate professor, Faculty of Science, University of Novi Sad
Member:	Marija Lesjak PhD, assistant professor, Faculty of Science, University of Novi Sad

BIOGRAFIJA



Luka Banjac je rođen 15. avgusta 1992 godine u Zrenjaninu. Osnovnu školu ,,Miloje Čiplić'' u Novom Bečeju završio je kao vukovac. Nakon završetka gimnazije u Novom Bečeju, 2011. upisuje Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu – Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, obrazovni profil Diplomirani biohemičar.